

**Physiologische und molekulare Charakterisierung
der Beziehung zwischen *Piriformospora indica*
und *rop*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana***



D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biol. Yvonne Venus
geboren am 20. Mai 1974 in Weimar

Jena
Juni 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Oelmüller (FSU Jena)
2. Prof. Dr. Erika Kothe (FSU Jena)
3. Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller (TU Dresden)

Tag der öffentlichen Disputation: 27.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
------------------------------------	------------

1	Einleitung	1
1. 1	Guaninnukleotid-bindende Proteine	1
1. 1. 1	Heterotrimere G-Proteine	1
1. 1. 2	Kleine G-Proteine	1
1. 2	Klassifizierung der kleinen G-Proteine von <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1. 3	Die kleinen G-Proteine der ROP-Familie	3
1. 4	ROP-regulierte Signalwege	3
1. 5	ROP-interagierende Proteine	6
1. 5. 1	ROP-GEFs: Guaninnukleotid-Austauschfaktoren	6
1. 5. 2	ROP-GAPs: GTPase-aktivierende Proteine	7
1. 5. 3	ROP-GDIs: Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren	8
1. 5. 4	RIC-Proteine (<i>Rop-interactive CRIB motif-containing proteins</i>)	8
1. 6	Differentielle Expression der <i>rop</i> -mRNAs	10
1. 7	Die Funktionen von ROP1 und ROP6	10
1. 8	Das Aktinzytoskelett und die Regulation der Aktin-Dynamik	12
1. 8. 1	Aktin-bindende Proteine	12
1. 8. 2	Aktin-bündelnde Proteine	13
1. 8. 3	Funktion und Regulation des ARP2/3-Komplexes	16
1. 9	Die Symbiose als Lebensgemeinschaft	17
1. 9. 1	<i>Piriformospora indica</i>	20
1. 9. 2	Molekulare Mechanismen der Interaktion von <i>Arabidopsis</i> mit <i>P. indica</i>	21
1. 10	Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	24
2. 1	Materialien	24
2. 1. 1	Geräte	24
2. 1. 2	Chemikalien	25
2. 1. 3	Enzyme	25
2. 1. 4	Kits und Fertigreagenzien	25
2. 1. 5	Molekulare Marker	26
2. 1. 6	Nukleotide und Oligonukleotide	26
2. 1. 7	Bakterienstämme, Vektoren und Klone	28
2. 1. 8	Standardmedien und Lösungen	28

2. 1. 9	Pflanzenmaterial	29
2. 2	Methoden	30
2. 2. 1.	Kultivierung und Transformation von Bakterien	30
2. 2. 1. 1	Kultivierung und Transformation von <i>E. coli</i>	30
2. 2. 1. 2	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
2. 2. 1. 3	Herstellung kompetenter <i>A. tumefaciens</i> GV3101/pMP90-Zellen	30
2. 2. 1. 4	Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i> GV3101/pMP90-Zellen	31
2. 2. 2	Kultivierung von <i>Arabidopsis</i>	31
2. 2. 3	Kultivierung von <i>P. indica</i>	31
2. 2. 4	Interaktionsexperimente von <i>Arabidopsis</i> mit <i>P. indica</i>	32
2. 2. 5	Isolation von Nukleinsäuren	32
2. 2. 5. 1	Isolation von DNA aus <i>Arabidopsis</i>	32
2. 2. 5. 2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2. 2. 5. 3	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i>	33
2. 2. 5. 4	Isolation von RNA aus Pflanzen	33
2. 2. 5. 5	Synthese von cDNA für RT-PCR und <i>real-time</i> PCR	34
2. 2. 5. 6	RT-PCR	34
2. 2. 5. 7	Amplifikation von DNA mit PCR	34
2. 2. 5. 8	Trennung und Dokumentation von DNA-Fragmenten auf dem Agarosegel	34
2. 2. 5. 9	<i>real-time</i> PCR	35
2. 2. 6	Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten	36
2. 2. 7	DNA-Sequenzierung nach Sanger <i>et al.</i> (1977)	36
2. 2. 8	Herstellung der Doppelmutante <i>rop1rop6</i>	37
2. 2. 8. 1	Herstellung der <i>Arabidopsis</i> -GFP-FABD2 <i>rop1</i> -, <i>rop6</i> - und <i>rop1rop6</i> -Linien	37
2. 2. 8. 2	Herstellung der <i>Arabidopsis</i> -pMAQ2 <i>rop1</i> -, <i>rop6</i> - und <i>rop1rop6</i> -Linien	37
2. 2. 9	Isolation des Zellwandextraktes aus <i>P. indica</i>	37
2. 2. 10	Ca ²⁺ -Messungen	37
2. 2. 11	Herstellung der <i>Arabidopsis</i> Überexprimierer OX- <i>rop1</i> und OX- <i>rop6</i>	38
2. 2. 11. 1	Herstellung der Überexpressionsplasmide pOX- <i>rop1</i> und pOX- <i>rop6</i>	38
2. 2. 11. 2	Transformation von <i>Arabidopsis</i> mit den Überexpressionsplasmiden pOX- <i>rop1</i> und pOX- <i>rop6</i>	39
2. 2. 12	Analyse der Keimung von <i>Arabidopsis</i> und den Mutanten <i>rop1</i> , <i>rop6</i> , <i>rop1rop6</i> , <i>ric4</i> , pOX- <i>rop1</i> und pOX- <i>rop6</i>	40
2. 2. 13	Untersuchung des Aktinzytoskeletts von <i>Arabidopsis</i> -GFP-FABD2 und den <i>Arabidopsis</i> -GFP-FABD2 <i>rop1</i> -, <i>rop6</i> -, <i>rop1rop6</i> -Mutanten	40
2. 2. 14	Färbemethoden für die Lichtmikroskopie zum Nachweis von <i>P. indica</i> - Sporen und ROS im <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp, <i>rop1</i> -, <i>rop6</i> -, <i>rop1rop6</i> -, OX- <i>rop1</i> -, OX- <i>rop6</i> - und <i>ric4</i> -Mutanten	41

2. 2. 15	Untersuchungen zur Wurzel- bzw. Wurzelhaarmorphologie von <i>Arabidopsis</i> und den Mutanten <i>rop1</i> , <i>rop6</i> , <i>rop1rop6</i> , <i>OX-rop1</i> und <i>OX-rop6</i>	42
2. 2. 16	GeneChip® Expressionsanalyse	42
2. 2. 17	Phylogenetische Analyse der kleinen G-Proteine	44
3	Ergebnisse	45
3. 1	Identifizierung von <i>rop1</i> -, <i>rop6</i> - und <i>ric4</i> -Mutanten	45
3. 1. 1	Genotypische Analyse der T-DNA-Insertionen	45
3. 1. 2	Analyse der genspezifischen mRNAs in den Mutanten <i>rop1</i> , <i>rop6</i> , <i>rop1rop6</i> und <i>ric4/3</i>	47
3. 1. 3	Quantifizierung der T-DNA durch quantitative PCR	49
3. 2	Die Überexpressionsmutanten <i>OX-rop1</i> und <i>OX-rop6</i>	49
3. 3	Phänotypische Charakterisierung der Mutanten	51
3. 3. 1	Analyse der Keimung	51
3. 3. 2	Wurzel- bzw. Wurzelhaarmorphologie im Wildtyp und in den Mutanten <i>rop1</i> , <i>rop6</i> , <i>rop1rop6</i> , <i>OX-rop1</i> und <i>OX-rop6</i>	52
3. 4	Interaktionsexperimente von <i>Arabidopsis</i> und den Mutanten <i>rop1</i> , <i>rop6</i> , <i>rop1rop6</i> , <i>OX-rop1</i> , <i>OX-rop6</i> , <i>ric4</i> mit <i>P. indica</i>	56
3. 4. 1	Ergebnisse der auf PNM-Medium durchgeführten Interaktionsexperimente	56
3. 4. 2	Ergebnisse der auf Erde durchgeführten Interaktionsexperimente	59
3. 4. 3	Nachweis der <i>P. indica</i> -Sporen in <i>Arabidopsis</i> und den Mutanten <i>rop1</i> , <i>rop6</i> , <i>rop1rop6</i> , <i>OX-rop1</i> , <i>OX-rop6</i> und <i>ric4</i>	62
3. 5	Veränderung der Struktur des Aktinzytoskeletts in den Wurzeln der Mutanten <i>rop1</i> , <i>rop6</i> und <i>rop1rop6</i>	64
3. 6	Auswertung der <i>microarray</i> -Experimente	69
3. 7	Ergebnisse der <i>real-time</i> PCR-Experimente	70
3. 8	Ergebnisse der Ca ²⁺ -Messungen in den <i>Arabidopsis</i> -Apoaequorin-Transformanten	76
3. 9	Klassifizierung und phylogenetische Analyse der kleinen G-Proteine in <i>Arabidopsis</i>	78
4	Diskussion	80
4. 1	Die kleinen G-Proteine ROP1 und ROP6 sowie das ROP-Effektor Protein RIC4 beeinflussen den Zeitpunkt der Keimung von <i>Arabidopsis</i>	80
4. 2	Der Einfluss von ROP1 und ROP6 auf die Wurzel von <i>Arabidopsis</i>	83
4. 3	ROP1 und ROP6 beeinflussen die Ausbildung von Wurzelhaaren	84
4. 5	<i>P. indica</i> beeinflusst die Transkription verschiedener Gene im <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp und in den Mutanten differentiell	91

4. 6	<i>P. indica</i> verursacht eine verstärkte Bildung von Aktinbündeln im <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp jedoch nicht in den <i>rop1</i> -, <i>rop6</i> - und <i>rop1rop6-knock-out</i> -Mutanten	95
4. 7	ROP1 und ROP6 sind nicht in den Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma involviert, der durch den Zellwandextrakt von <i>P. indica</i> ausgelöst wird	98
4. 8	Modell für die Rolle von ROP1 und ROP6 in der Interaktion von <i>Arabidopsis</i> mit <i>P. indica</i>	100
5	Zusammenfassung	103
6	Summary	105
7	Literaturverzeichnis	107
	Danksagung	123
	Publikationen	124
	Tagungsbeiträge	125
	Lebenslauf	126
	Ehrenwörtliche Erklärung	127

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABA	<i>abscisic acid</i> (Abscisinsäure)
Abb.	Abbildung
ABD	<i>actin binding domain</i>
<i>A. dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
ADF	<i>actin depolymerizing factors</i>
ARF	<i>ADP ribosylation factor</i>
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	konstitutiv aktive Mutante
C	Cytosin
Cdc42	<i>cell division cycle42</i>
cDNA	<i>copy</i> (komplementäre DNA)
°C	Grad Celcius
CP	<i>crossing point</i>
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DN	dominant negative Mutante
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DRMs	<i>detergent-resistant membrane domains</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (Lateinisch: und andere)
evtl.	eventuell
<i>g</i>	<i>gravity</i> (Erdbeschleunigung)
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Nährmedium für Bakterien)
LBa1	<i>left border</i> -Primer
LP	<i>left primer</i>
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>

MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MATH	<i>meprin and TRAF [tumor necrosis factor receptor associated factor] homology</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS-Medium	Medium nach Murashige und Skoog
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>
NBT	Nitroblautetrazolium
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
OX	Überexpressions-
p. a.	<i>pro analysi</i> (für die Analyse)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>P. i.</i>	<i>Piriformospora indica</i>
<i>PINs</i>	Auxin-Efflux-carrier
PRONE	<i>plant-specific ROP nucleotide exchanger</i> -Domäne
®	<i>registered</i>
RAB	<i>Ras-like proteins from rat brain</i>
RAC	<i>Ras related C3 botulinum toxin substrate</i>
RAN	<i>ras-related nuclear protein</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RHO	<i>Ras homologous</i>
RIC	<i>ROP-interactive CRIB motif-containing protein</i>
RLS	<i>Rhizobium-legume symbiosis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROP	<i>Rho-like GTPases of plants</i>
ROP-GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
ROP-GDI	<i>Guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>
ROP-GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RP	<i>right primer</i>
RLU	<i>relative light units</i> (relative Lichteinheiten)
RT	Reverse Transkription/Transkriptase
s	Sekunde
s.	siehe
SE	<i>standard error</i> (Standardfehler)
STABW	Standardabweichung vom Mittelwert
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TBE	<i>Tris</i> -gepuffertes EDTA
T-DNA	Transfer-DNA
Upm	Umdrehungen pro min
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
VAM	vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZWE	Zellwandextrakt

1 Einleitung

1. 1 Guaninnukleotid-bindende Proteine

Pflanzen nehmen eine Vielzahl von Umweltreizen wahr, auf die sie entsprechend reagieren. Für eine Reaktion auf Umweltreize sind Mechanismen zur Wahrnehmung und Weiterleitung der Signale notwendig. Eine bedeutende Rolle in der pflanzlichen Signaltransduktion spielen GTP (Guanosintriphosphat)-bindende Proteine. Zu den GTP-bindenden Proteinen gehören die heterotrimeren G-Proteine, die kleinen G-Proteine und verschiedene GTP-bindende Proteine, die den zuvor genannten Gruppen nicht zugeordnet werden können (Assmann, 2002) und auf die in dieser Arbeit nicht eingegangen wird.

1. 1. 1 Heterotrimere G-Proteine

Die heterotrimeren G-Proteine bestehen aus den 3 Untereinheiten α , β und γ . Diese G-Proteine sind häufig mit Plasmamembranrezeptoren assoziiert. Die Aktivierung eines Rezeptors führt zu einer Aktivierung des G-Proteins durch den Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit. Die α -Untereinheit kann das β/γ -Dimer nun verlassen und beide Komponenten können mit Effektoren interagieren. In Säugern wurden mehr als 20 verschiedene α -Untereinheiten, 5 β -Untereinheiten und 12 γ -Untereinheiten identifiziert. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurden dagegen lediglich eine α - und eine β -Untereinheit sowie zwei verschiedene γ -Untereinheiten gefunden. In Pflanzen sind heterotrimere G-Proteine in verschiedenen Signalwegen, wie der Weiterleitung von Licht- und Hormonsignalen oder der Antwort auf Pathogene involviert (Assmann, 2002).

1. 1. 2 Kleine G-Proteine

Aufgrund der geringen Anzahl von unterschiedlichen α -, β - und γ -Untereinheiten sind die Kombinationsmöglichkeiten für heterotrimere G-Proteine in Pflanzen verglichen mit denen in Säugern beschränkt, so dass den kleinen G-Proteinen in Pflanzen eine wichtige Rolle zuzukommen scheint (Yang, 2002). Kleine G-Proteine werden häufig als kleine GTPasen bezeichnet und sind in der Signaltransduktion der Eukaryoten von großer Bedeutung. Sie weisen ein Molekulargewicht von 21 bis 40 kD auf und bestehen aus einer Untereinheit, die Ähnlichkeit zu der α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine aufweist.

Alle kleinen G-Proteine gehören zu einer gemeinsamen übergeordneten Familie, der sogenannten RAS-Superfamilie. Entdeckt wurden die kleinen G-Proteine als Onkogene im *Sarkoma-Virus* 1978/79 (Takai *et al.*, 2001). Die RAS-Superfamilie besteht aus 5 Familien: RAS (*rat sarcoma*), RAB (*ras-like proteins from rat brain*), ARF (*ADP ribosylation factor*), RHO (*ras homologous*) und RAN (*ras-related nuclear protein*) (Bischoff *et al.*, 1999). RAS-GTPasen sind u. a. an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und am Zelltod von

Säugetierzellen beteiligt (Takai *et al.*, 2001). RHO-GTPasen sind in die Regulation des Aktinzytoskeletts involviert. RAB- und ARF-GTPasen sind an unterschiedlichen Schritten des Vesikelverkehrs zwischen Membranen beteiligt. RAN-GTPasen regulieren den Transport von Proteinen und RNA durch die Poren der Kernmembran (Vernoud *et al.*, 2003). Für RAS- und RHO-GTPasen wurde die Weiterleitung extrazellulärer Signale nachgewiesen. Die Mitglieder dieser Familien besitzen strukturelle Gemeinsamkeiten, wie die 4 GTP-bindenden Domänen, die konservierte Aminosäuresequenzen aufweisen und die für die spezifische Interaktion mit GDP bzw. GTP sowie für die GTPase-Aktivität verantwortlich sind (Abb. 1. 1). Eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit stellt die Effektor-bindende Domäne dar, die die Interaktion mit spezifischen Effektoren ermöglicht (Zheng und Yang, 2000; Takai *et al.*, 2001). RAS-, RAB- und RHO-GTPasen besitzen an ihrem C-Terminus ein Motiv für Prenylierung, ARF-GTPasen hingegen besitzen am N-Terminus ein Myristoylierungs-Motiv. Diese Lipidmodifikationen sind für die Interaktion und Lokalisation der GTPasen mit Membranen und Proteinen essentiell. In RAN-GTPasen wurden bisher keine Sequenzen für solche posttranslationalen Modifikationen gefunden (Takai *et al.*, 2001; Yang, 2002).

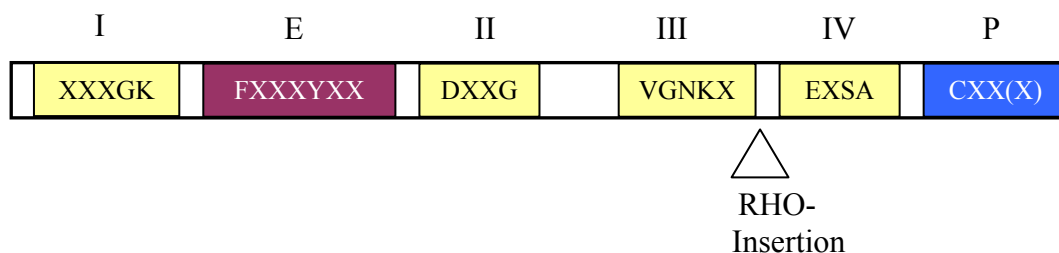


Abb. 1. 1: Konservierte Strukturen kleiner G-Proteine. Alle kleinen G-Proteine besitzen 4 konservierte Domänen zur Interaktion mit GDP/GTP und für die GTPase Aktivität (I-IV), sowie eine Effektor-bindende Domäne (E). Die RHO-Insertion wurde nur in RHO-GTPasen gefunden und umfasst 10-12 Aminosäuren. RAB-, RAS- und RHO-GTPasen weisen am C-Terminus ein Motiv zur Prenylierung auf. ARF-GTPasen besitzen am N-Terminus ein Myristoylierungs-Motiv. In RAN-GTPasen wurden keine Modifikationen gefunden (nach Yang, 2002).

Kleine G-Proteine funktionieren als molekulare Schalter, d. h. sie liegen im aktiven GTP-gebundenen Zustand oder im inaktiven GDP-gebundenen Zustand vor. An der Regulation dieser zwei Zustände sind weitere Proteine beteiligt, dazu gehören Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factor*, GEFs), die den Austausch von GDP durch GTP vermitteln. Aktivierte kleine G-Proteine besitzen eine geringe intrinsische GTPase Aktivität. Für eine effiziente Inaktivierung sind GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) notwendig, sie unterstützen die Hydrolyse von GTP zu $\text{GDP}^{+ \text{Pi}}$. Für eine Aktivierung der kleinen G-Proteine durch GEFs ist die Assoziation mit der Plasmamembran erforderlich.

Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) unterbinden die Aktivierung kleiner G-Proteine durch drei Mechanismen:

1. Verhinderung der Dissoziation von GDP,
2. Bindung an GDP-gebundene kleine G-Proteine und
3. Entfernung von der Membran (Takai *et al.*, 2001; Yang, 2002; Vernoud *et al.*, 2003).

1. 2 Klassifizierung der kleinen G-Proteine von *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis* wurden 93 kleine G-Proteine identifiziert, die in die 4 Familien RAB (57 GTPasen), ARF (21 GTPasen), ROP (11 GTPasen) und RAN (4 GTPasen) eingeteilt werden. In Pflanzen konnten keine RAS-GTPasen identifiziert werden. Die RHO-GTPase Familie der Säuger wird in die Unterfamilien RHO, RAC (*ras related C3 botulinum toxin substrate*) und Cdc42 (*cell division cycle42*) gegliedert. Anstelle der aus Säugern bekannten RHO-GTPase Familie besitzen Pflanzen eine eigene Unterfamilie: die ROP-GTPasen (*rho-like GTPases of plants*). Die ROP-GTPasen scheinen einen gemeinsamen Vorläufer mit den RHO-, Cdc42- und RAC-Unterfamilien von Säugern und *Saccharomyces cerevisiae* zu besitzen (Yang, 2002; Vernoud *et al.*, 2003).

1. 3 Die kleinen G-Proteine der ROP-Familie

Im Genom von *Arabidopsis* konnten 11 ROP-GTPase-Gene (*rops*) identifiziert werden. Die Nomenklatur dieser Gruppe ist in der Literatur nicht einheitlich. Obwohl die ROPs eindeutig einer eigenen Unterfamilie zugeordnet werden können (Yang, 2002; Vernoud *et al.*, 2003; Berken, 2006), wurde auf Grund einer geringen Ähnlichkeit zu den menschlichen RAC-Proteinen von einigen Gruppen die Bezeichnung RAC-GTPasen eingeführt (Winge *et al.*, 1997; 2000; Kost *et al.*, 1999; Lemichez *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wird die Bezeichnung ROP-GTPasen bzw. ROPs verwendet (Yang, 2002; Berken, 2006).

1. 4 ROP-regulierte Signalwege

ROP-GTPasen (ROPs) kontrollieren eine Vielzahl von lebenswichtigen Signalwegen im Lebenszyklus einer Pflanze. Sie sind an der Ausbildung der Zellpolarität, an Wachstumsprozessen, an der Morphogenese, der Zellteilung, der Weiterleitung von Hormonsignalen sowie an pathogenen und nicht-pathogenen Interaktionen beteiligt. Weiterhin sind sie für endo- und exozytotische Prozesse, Membranverkehr und Membranregenerierung, für abiotische Stressantworten, Meristemerhaltung und Differenzierung des Xylems von Bedeutung (Reviews: Gu *et al.*, 2004; Molendijk *et al.*, 2004;

Samaj *et al.*, 2006; Berken, 2006; Nibau *et al.*, 2006; Yang und Fu, 2007; Lee und Yang, 2008; Berken und Wittinghofer, 2008; Yalovsky *et al.*, 2008). Einen Überblick über die von ROPs regulierten Signalwege gibt die Abb. 1. 2. ROP-GTPasen sind durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt, wie im linken Teil der Abb. 1. 2 zu sehen ist. Durch die ROP-induzierte Aktivierung von RIC4, die Aktivierung des SCAR/WAVE- und ARP2/3-Komplexes (verändert nach Hussey *et al.*, 2006; Berken und Hülkamp, 2006) und die Hemmung von ADF (*actin depolymerizing factor*) wird die Dynamik des Aktinzytoskeletts beeinflusst.

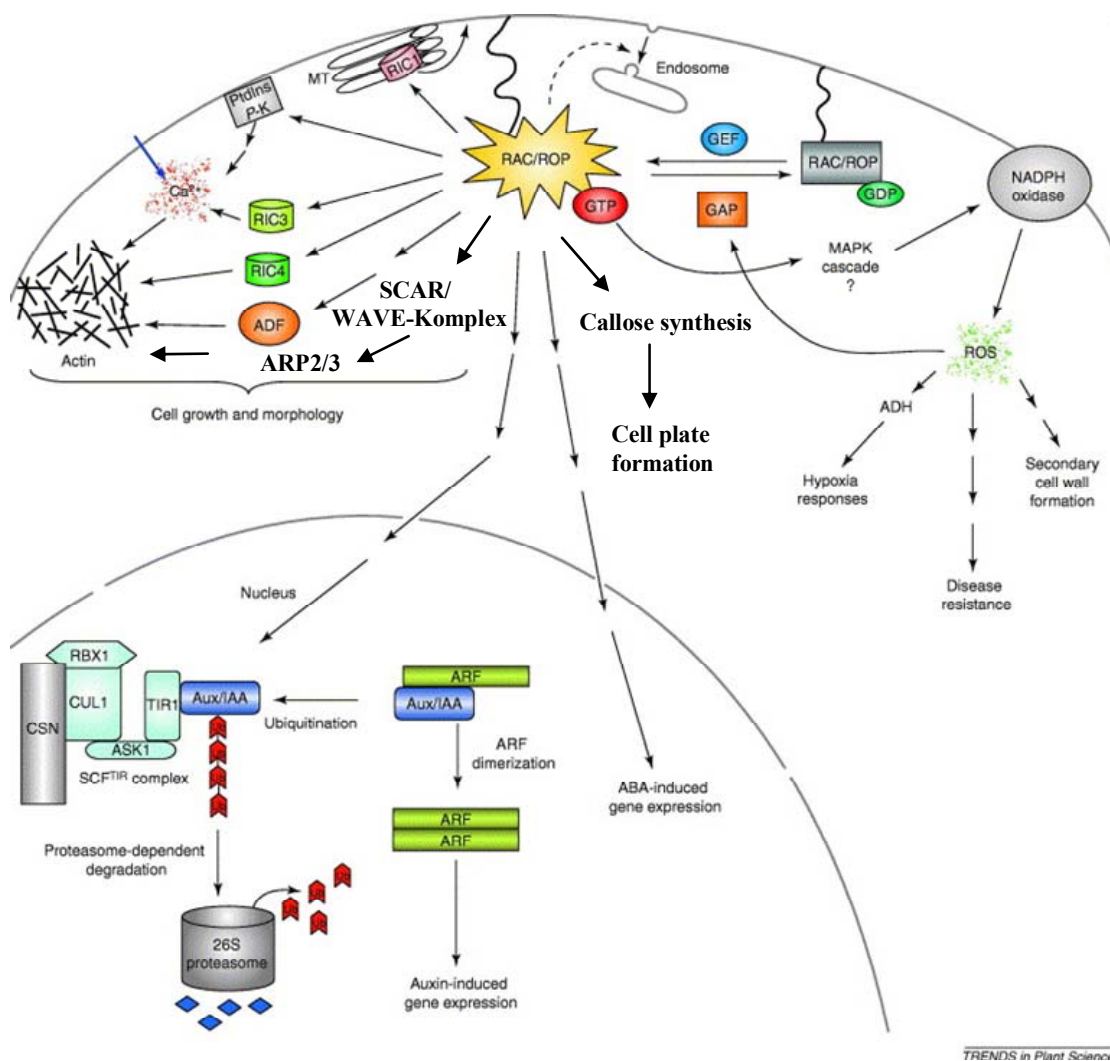


Abb. 1. 2: Schematische Darstellung der von ROPs regulierten Signalwege verändert von Nibau *et al.* (2006). ROP-GTPasen sind an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt. Sie haben Einfluss auf die Genexpression, ROS-vermittelte Signaltransduktionswege, Stress- und Entwicklungsprozesse sowie Hormonsignalwege.

ROP-Proteine regulieren auch die Mikrotubuli-Dynamik, so führt die ROP-induzierte Entfernung von RIC1 von den Mikrotubuli zur Inaktivierung von RIC1. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass ROP-Proteine den zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel beeinflussen, der u. a. essentiell für die Dynamik des Aktinzytoskeletts ist. Ein möglicher ROP-Effektor könnte die PtdInsP-Kinase (Phosphatidylinosit-Monophosphat-Kinase) sein, durch deren Produkt PIP2 (Phosphatidylinosit (4, 5)-bisphosphat) Veränderungen des Ca^{2+} -Spiegels induziert werden. Die Regulation der Aktin- und Mikrotubuli-Dynamik und des Ca^{2+} -Spiegels ist essentiell für die Morphologie diffus und polar wachsender Zellen.

Ein weiterer ROP-Effektor ist die UDP-Glukose-Transferase (UGT1). UGT1 führt den Transfer von UDP-Glukose auf die katalytische Untereinheit der Callose-Synthase während der Bildung der Zellplatte bei der Zellteilung durch (verändert nach Berken, 2006). Auf der rechten Seite der Abb. 1. 2 ist die Regulation der Produktion von ROS (*reactive oxygen species*) zu sehen. Diese geschieht vor allem durch die Aktivierung der Membran-gebundenen NADPH-Oxidase. Eine MAP-Kinase-Kaskade (*mitogen-activated protein kinase*) könnte die Aktivierung der NADPH-Oxidase vermitteln. ROS sind für die Ausbildung der Sekundärwand und für die Krankheitsresistenz von Bedeutung. ROS regulieren auch die Alkoholdehydrogenase und die Reaktionen bei Sauerstoffmangel. ROS stimulieren die Expression von GAPs, dies führt zur ROP-Inaktivierung, vermutlich um toxische ROS-Konzentrationen zu verhindern. In der Mitte des Bildes ist die Regulation von Auxin- und ABA-Signalwegen zu sehen. Auxin führt zur Aktivierung von ROPs und vermittelt die Auxin-induzierte Genexpression durch den Abbau der Aux/IAA-Transkriptions-Repressorproteine. Aux/IAA-Proteine werden durch den Ubiquitin/Proteasomen-abhängigen Proteolyse-Weg inaktiviert. Der freie *Auxin Response Faktor* (ARF) kann dimerisieren und die Auxin-induzierte Genexpression stimulieren. Im Gegensatz dazu werden ROPs durch ABA (*abscisic acid*) inaktiviert, wodurch verschiedene durch ABA regulierte Antworten ausgelöst werden, z. B. die Genexpression. Die zwischengeschalteten Signalkomponenten der von ROPs regulierten Signalwege sind weitestgehend unbekannt (Nibau *et al.*, 2006).

1. 5 ROP-interagierende Proteine

Zu den interagierenden Proteinen der ROPs gehören die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factor*, ROP-GEFs), GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase-activating protein*, ROP-GAPs), Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*, ROP-GDIs) und RICs (*ROP-interactive CRIB motif-containing proteins*) (Wu *et al.*, 2001; Yang, 2002; Vernoud *et al.*, 2003).

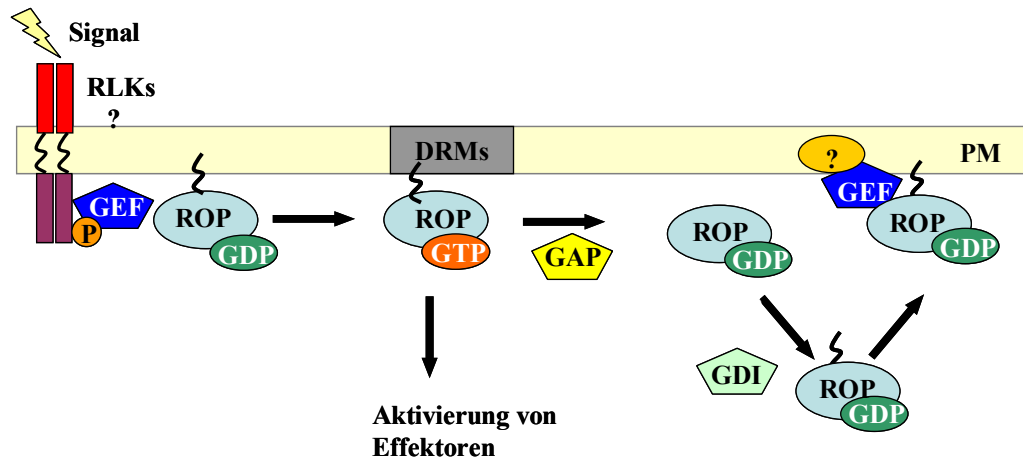


Abb. 1. 3: Aktivierung und Deaktivierung von ROPs verändert von Nibau *et al.* (2006). ROP-GTPasen wechseln zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand. GEFs stimulieren nach ihrer Aktivierung den Austausch von GDP durch GTP und aktivieren die an der Plasmamembran (PM) befindlichen ROPs. In ihrem aktivierten Zustand sind einige ROPs vermutlich Bestandteil von Membran-Mikrodomänen (DRMs: *detergent-resistant membrane domains*). GAPs stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität der ROPs, und führen zur Rückkehr in den GDP-gebundenen Zustand. GDIs sind negative Regulatoren der ROPs, sie entfernen die ROPs von der Zellmembran und verhindern so ihre Aktivierung durch Membran-gebundene GEFs. Über die Prozesse, die zur Aktivierung der GEFs führen, ist noch wenig bekannt. Rezeptor-ähnliche Kinasen sind potentielle Rezeptoren, die ROP-vermittelte Signaltransduktionswege auslösen können. ?: unbekannte Rezeptorkomponenten, P: potentielle GEF-Phosphorylierung durch Rezeptorkinasen

1. 5. 1 ROP-GEFs: Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

RHO-GEFs fördern den Austausch von GDP mit GTP und aktivieren dadurch RHO-GTPasen (Abb. 1. 3). RHO-GEFs wurden schon vor einiger Zeit in Tieren und Pilzen entdeckt, sie besitzen zwei spezifische Domänen, eine sogenannte Dbl- bzw. DH-Domäne (*diffuse B-cell lymphoma homology*) und eine Pleckstrin-homologe Domäne (Cerione und Zheng, 1996). Weder im Genom von *Arabidopsis* noch von Reis konnten ähnliche Proteine mit einer DH-Domäne gefunden werden. In Säugern wurden DOCK180- und ELMO-Proteine als RAC-GEFs identifiziert. ELMO und DOCK180 sind gemeinsam für eine Beladung von RAC mit GTP erforderlich (Brugnera *et al.*, 2002). In *Arabidopsis* wurde ein Protein mit DOCK180-Homologie entdeckt, SPIKE1 (Qui *et al.*, 2002). Eine ROP-GEF-Aktivität und

eine Beteiligung an der Regulation der Aktinpolymerisation konnte inzwischen nachgewiesen werden (Basu *et al.*, 2008). Im Jahr 2005 wurde eine neue, nur in Pflanzen vorkommende Familie von ROP-GEFs in *Arabidopsis* identifiziert (Berken *et al.*, 2005). Die 14 in *Arabidopsis* identifizierten ROP-GEFs weisen variable Aminosäuresequenzen am N- und C-Terminus auf, besitzen aber eine zentrale, konservierte sowie katalytisch aktive und ROP-bindende Domäne, die sogenannte PRONE-Domäne (*plant-specific ROP nucleotide exchanger*) (Berken *et al.*, 2005; Berken, 2006). Die Untersuchung von ROP-GEF1 in *Arabidopsis*-Pollen zeigte, das ROP1 durch ROP-GEF1 aktiviert wird und am polaren Wachstum des Pollenschlauches beteiligt ist (Gu *et al.*, 2006). In Pollen von Tomate und *Arabidopsis* konnte eine Interaktion von ROP-GEFs mit der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptorkinasen LePRK2 und AtPRK2a nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Interaktion von ROP-GEFs mit aktivierten Rezeptorkinasen eine Aktivierung der ROPs auslösen, welche anschließend eine Weiterleitung des Signals durch die Interaktion mit Effektoren bewirken (Kaothien *et al.*, 2005; Zhang und McCormick, 2007).

1. 5. 2 ROP-GAPs: GTPase-aktivierende Proteine

RHO-GAPs fördern die intrinsische GTPase Aktivität von RHO-Proteinen und führen dadurch zu einer Inaktivierung des RHO-Proteins (Abb. 1. 3). Die katalytisch aktive RHO-GAP-Domäne umfaßt ca. 150 Aminosäuren und bildet ein Arginin-Finger Motiv, das in die GTPase-aktive Seite der RHO-GTPase ragt. In *Arabidopsis* wurden 3 Familien gefunden, die eine konservierte ROP-GAP-Domäne aufweisen. Die am besten charakterisierte Familie besteht aus 6 Mitgliedern und weist neben der GAP-Domäne ein CRIB-Motiv auf. Das CRIB-Motiv wurde in tierischen RAC- und Cdc42-Effektoren entdeckt. *In vitro* Versuche in *Arabidopsis* zeigten eine verstärkte GTPase-Aktivität von ROP1 durch ROP-GAP1. Das CRIB-Motiv ist dabei für die Bindung von ROP1 und die GTPase-Aktivität notwendig (Brembu *et al.*, 2006; Berken und Wittinghofer, 2008). In *Arabidopsis* wird unter Sauerstoffmangel verstärkt H₂O₂ durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase gebildet, die von einem unbekannten ROP-Protein ausgelöst wird. Die verstärkte Bildung von H₂O₂ führt zur Expression der Alkoholdehydrogenase, einem Enzym der alkoholischen Gärung. Eine negative Rückkopplung dieses Prozesses kommt durch die H₂O₂-ausgelöste Expression von ROP-GAP4 zustande, was zur Beendigung der Aktivität der ROP-GTPase führt und dadurch eine Schädigung durch reaktive Sauerstoff-Spezies verhindert (Baxter-Burell *et al.*, 2002). Eine zweite ROP-GAP-Familie, bestehend aus 3 Mitgliedern, weist neben der GAP-Domäne eine N-terminale PH-Domäne (*pleckstrin homology*) auf. PH-Domänen besitzen die Fähigkeit Phosphoinositide zu binden. Phosphoinositide wie Diazylglyzerin oder Inositoltriphosphat können indirekt als Enzymsubstrate oder direkt als *second messenger* dienen. Möglicherweise sind für die Aktivität und/oder die Lokalisation der ROP-GAPs Phosphoinositide von

Bedeutung (Brembu *et al.*, 2006). Die dritte ROP-GAP-Familie besteht aus nur einem Mitglied. Dieses Protein besitzt neben der GAP-Domäne keine weiteren bekannten Motive und wurde bisher nicht hinsichtlich der Aktivität seiner GAP-Domäne untersucht (Brembu *et al.*, 2006; Berken und Wittinghofer, 2008).

1. 5. 3 ROP-GDIs: Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren

RHO-GDIs regulieren die Aktivität der RHO-GTPasen durch Hemmung der GDP-Dissoziation, Hemmung der GTP-Hydrolyse und Interaktion mit GAPs, GEFs und Effektoren sowie durch die Entfernung der RHO-GTPasen von der Plasmamembran und Transport in das Zytoplasma (Abb. 1. 3). Im Genom von *Arabidopsis* wurden drei ROP-GDIs identifiziert, die eine große Ähnlichkeit zu den RHO-GDIs von Säugern zeigen, mit Ausnahme von 50 Aminosäuren am N-Terminus. Die Aminosäurereste Asp45 und Asp185 sind für die Hemmung der GDP-Dissoziation von Cdc42 essentiell und finden sich auch in den drei ROP-GDIs von *Arabidopsis* (Takai *et al.*, 2001; Brembu *et al.*, 2006). ROP-GDIs sind für die Lokalisation und Aktivität von ROPs während des Pollenschlauchwachstums und der Wurzelhaarmorphogenese von Bedeutung. Die Überexpression von ROP-GDI1 in Pollenschläuchen von Tabak unterdrückt die Wachstumsstörung, die durch die Überexpression von ROP1 verursacht wird (Fu *et al.*, 2001). In der *Arabidopsis*-Mutante ROP-GDI1 (*scn1*) verursacht das Fehlen von SCN1 eine Akkumulation von ROP2 an der Zellmembran der Rhizodermiszelle. Durch die ektopische Lokalisation von ROP2 kommt es zur Ausbildung von zahlreichen Wurzelhaaranlagen anstelle von nur einer Wurzelhaaranlage je Trichoblast. Auch während der Elongation des Wurzelhaares verbleibt ROP2 in *scn1*-Mutanten an der Zellmembran, im Wildtyp befindet sich ROP2 während dieses Stadiums im Zytoplasma in der Nähe der wachsenden Spitze (Carol *et al.*, 2005). In *yeast two-hybrid* Analysen und *protein pull down-assays* konnte eine Interaktion von ROP-GDI1 mit ROP4 und ROP6 von *Arabidopsis* gezeigt werden (Bischoff *et al.*, 2000).

1. 5. 4 RIC-Proteine (*Rop-interactive CRIB motif-containing proteins*)

Das CRIB-Motiv wurde in Cdc42- und RAC-Effektoren von *Saccharomyces cerevisiae* und von tierischen Zellen gefunden. Zu diesen Effektoren, die Cdc42- und RAC-Proteine GTP-abhängig binden, gehören die Pak-Kinasen (p21-aktivierte Kinasen). Die Pak-Kinasen gehören zu den Serin-Threonin-Kinasen und phosphorylieren nach ihrer Aktivierung eine Vielzahl von Proteinen. Pak-Kinasen sind an der Regulation der durch MAP-Kinasen ausgelösten Genexpression ebenso beteiligt, wie an der Organisation des Mikrotubuli- und Aktinzytoskeletts (Takai *et al.*, 2001). In Pflanzen wurde bisher keine Pak-Homologe identifiziert. Stattdessen wurden zwei Pflanzen-spezifische Familien entdeckt, die das CRIB-Motiv besitzen, dazu gehören die bereits erwähnten ROP-GAPs und die RICs (Brembu *et al.*,

2006). RICs sind kleine Proteine mit einer Sequenz von 116 bis 224 Aminosäuren, die abgesehen vom CRIB-Motiv, keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen zeigen. Durch *pull down-assays* konnte gezeigt werden, dass RIC1 nur mit aktiviertem, d. h. GTP-gebundenen ROP1 interagiert und dass das CRIB-Motiv für die Interaktion beider Proteine essentiell ist (Wu *et al.*, 2001). 11 RICs wurden durch Datenbank-Recherchen gefunden, jedoch konnten *ric8* und *ric11* nicht in *Arabidopsis* nachgewiesen werden, so dass es sich möglicherweise um Pseudogene oder nur in bestimmten Entwicklungsstadien exprimierte Gene handelt. Die meisten *rics* werden konstitutiv in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis* exprimiert, nur *ric3*, *ric5* und *ric6* sind Blüten-spezifisch (Wu *et al.*, 2001). Für RIC3 und RIC4 konnte die Interaktion mit aktivem ROP1 *in vivo* nachgewiesen werden. Die Interaktion von ROP1 mit RIC4 begünstigt die Zusammenlagerung des F-Aktins an der Spitze des Pollenschlauches von Tabakpollen. Im Gegensatz dazu fördert die ROP1-abhängige Aktivierung des RIC3-Signalweges in einem Ca^{2+} -abhängigen Prozess den Abbau der Aktinstrukturen (Gu *et al.*, 2005). Die ROP1-abhängige Dynamik des F-Aktins ist für das Spitzenwachstum von Pollenschläuchen essentiell (Fu *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen eine Beteiligung an der gerichteten Exozytose durch die ROP1-abhängige Regulation der Aktin-Dynamik. Die RIC4-vermittelte F-Aktin Zusammenlagerung an der Pollenschlauchspitze geht mit einer Vesikel-Akkumulation einher, der RIC3-vermittelte F-Aktin-Abbau hingegen induziert die Exozytose an der Spitze (Lee *et al.*, 2008).

Neben dem polar gerichteten Wachstum der Pollenschläuche wurde auch das unpolare Wachstum von Blattepidermiszellen in *Arabidopsis* untersucht. Diese Blattepidermiszellen ähneln Puzzelteilen, die verzahnend ineinandergreifen. Das Auswachsen eines bestimmten Zellbereiches kommt durch die lokale Aktivierung von ROP2 zustande. ROP2 aktiviert RIC4, wodurch die Zusammenlagerung von F-Aktin gefördert wird. Durch die Zusammenlagerung des F-Aktins kommt es zu einem lokalen Auswachsen dieses Zellbereiches. Gleichzeitig wird RIC1 durch ROP2 inaktiviert. RIC1 gehört zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen. Es fördert einerseits eine geregelte Mikrotubuli-Organisation und hemmt die laterale Expansion an den Verengungen bzw. Einbuchtungen der Blattepidermiszellen und unterdrückt andererseits die Aktivierung von ROP2 (Fu *et al.*, 2005). Über die Aktivierung von ROP2 ist bisher nichts bekannt, aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch, dass ROP6 an RIC1 bindet und vermutlich an der Aktivierung von RIC1 beteiligt ist (Fu *et al.*, 2009).

1. 6 Differentielle Expression der *rop*-mRNAs

Die differentielle Expression der *rop*-Gene wurde mit RT-PCR in den unterschiedlichen Geweben von *Arabidopsis* untersucht. Die mRNAs von *rop2*, *rop3*, *rop4* und *rop10* werden in allen getesteten Geweben (Blüten, Schoten, Blätter, Wurzeln und Sproß) exprimiert. Das Transkript von *rop5* ist in Wurzeln nur in geringem Maße nachweisbar. Das *rop6*-Gen wird nicht in Schoten exprimiert. Das Vorhandensein der *rop1*-mRNA ist blütenspezifisch (Li *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2002). Die mRNA von *rop7* wurde nur im Sproß und in der Wurzel nachgewiesen. Keine Informationen gibt es zur gewebespezifischen Expression von *rop8*, *rop9* und *rop11* (Vernoud *et al.*, 2003).

1. 7 Die Funktionen von ROP1 und ROP6

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der kleinen G-Proteine ROP1 und ROP6 von *Arabidopsis* für die Interaktion mit dem endophytisch lebenden Pilz *Piriformospora indica* untersucht. Dieses Kapitel fasst die bekannten Funktionen von ROP1 und ROP6 zusammen. *Rop1* wird als das einzige Blüten-spezifische *rop*-Gen in *Arabidopsis* beschrieben. Es handelt sich um ein spätes Pollengen, welches die größten Sequenzübereinstimmungen zu *rop3* und *rop5* zeigt. Die mRNAs von *rop3* und *rop5* werden ebenfalls in reifen Pollen exprimiert, allerdings in geringerem Maße als *rop1*. Für ROP1, ROP3 und ROP5 wird eine redundante Funktion während des Pollenschlauchwachstums angenommen (Li *et al.*, 1998). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität von ROP1 durch verschiedene ROP-interagierende Proteine reguliert wird. So wird ROP1 durch ROP-GEF1 (s. 1. 5. 1) aktiviert und durch ROP-GAP1 (s. 1. 5. 2) inaktiviert, wobei das CRIB-Motiv von ROP-GAP1 für die Bindung von ROP1 und die GTPase-Aktivität notwendig ist (Gu *et al.*, 2006, Brembu *et al.*, 2006; Berken und Wittinghofer, 2008). Die Überexpression von ROP-GDI1 in Pollenschläuchen unterdrückt die Wachstumsstörung, die durch die Überexpression von ROP1 verursacht wird (Fu *et al.*, 2001). Die Wirkungsweise von ROP-GDIs wurde unter 1. 5. 3 beschrieben.

Bekannte Effektoren von ROPs sind RIC-Proteine. So konnte mit *pull down-assays* gezeigt werden, dass RIC1 nur mit aktiviertem, d. h. GTP-gebundenen ROP1 interagiert, und dass das CRIB-Motiv für die Interaktion beider Proteine essentiell ist (Wu *et al.*, 2001). Für RIC3 und RIC4 konnte die Interaktion mit aktivem ROP1 *in vivo* nachgewiesen werden. Die Interaktion von ROP1 mit RIC4 begünstigt die Zusammenlagerung des F-Aktins an der Spitze des Pollenschlauches. Im Gegensatz dazu fördert die ROP1-abhängige Aktivierung des RIC3-Signalweges in einem Ca^{2+} -abhängigen Prozess den Abbau der Aktinstrukturen (Gu *et al.*, 2005). Fu *et al.* (2001) konnte zeigen, dass die ROP1-abhängige Dynamik des F-Aktins für das Spitzenwachstum von Pollenschläuchen essentiell ist. Neuere Untersuchungen zeigen eine Beteiligung an der gerichteten Exozytose durch die ROP1-abhängige Regulation der Aktin-Dynamik. Dabei kommt es durch die RIC4-vermittelte F-Aktin Zusammenlagerung an der Spitze des Pollenschlauches zu einer Vesikel-Akkumulation, RIC3 hingegen vermittelt den

F-Aktin-Abbau und induziert die Exozytose an der Spitze (Lee *et al.*, 2008). ROP1 reguliert wahrscheinlich die Lokalisation von CNGC18 (*cyclic nucleotide-gated channel18*). CNGCs sind für Ca^{2+} -durchlässige, nicht selektive Kationenkanäle. Durch die Aktivität von ROP1 ist das pollenspezifische Protein CNGC18 hauptsächlich an der Spitze des Pollenschlauches in der Plasmamembran nachweisbar und dort vermutlich für die Ca^{2+} -Leitfähigkeit verantwortlich (Chang *et al.*, 2007). Die Untersuchung von ROP1 einschließlich der mit ROP1 interagierenden bzw. regulierten Proteine von *Arabidopsis* erfolgte in Tabak-Pollenschläuchen.

Die mRNA von *rop6* konnte in allen getesteten Geweben von *Arabidopsis* mit Ausnahme von Schoten und geschlossenen Blüten nachgewiesen werden (Li *et al.*, 1998). ROP6 wurde in seiner aktiven, d. h. GTP-gebundenen Form in *lipid rafts* nachgewiesen werden. *Lipid rafts* sind Triton X-100-unlösliche Fraktionen und enthalten azylierte Proteine. ROP6 weist in *lipid rafts* neben einem Prenylierungsmotiv eine Acylierung auf. Möglicherweise werden ROPs nur in *lipid rafts* aktiviert und stabilisieren sich selbst durch Acylierung (Sorek *et al.*, 2007). Verschiedene ROPs werden als positive Regulatoren von Auxin-Signalwegen vermutet. Die Informationen über die Regulation dieser Signalwege sind gering. ROP6 und ROP1 gehören jedoch zu den ROPs, die Auxin-abhängig und Auxin-unabhängig die Expression des Auxin-induzierbaren Promotors DR5 in Tabak-Protoplasten stimulieren (Tao *et al.*, 2002).

ROP6 ist auch in die Schließung der Stomata involviert. Normalerweise wird das Schließen der Stomata durch ABA induziert. ABA führt zur Inaktivierung von ROP6 in Abhängigkeit von der verwendeten ABA-Konzentration. Dominant negative (DN) *rop6*-Mutanten imitieren jedoch den ABA-induzierten Schluß der Stomata. Sie weisen die typischen aufgelösten Aktinstrukturen auf. In konstitutiv aktiven (CA) *rop6*-Mutanten kann der Stomata-Schluß auch durch die Zugabe von ABA nicht herbeigeführt werden. In den Schließzellen werden die Aktinkabel nicht aufgelöst (Lemichez *et al.*, 2001). ROP6 ist vermutlich an der Aktivierung von RIC1 in Blattepidermiszellen beteiligt (Fu *et al.*, 2009). Blattepidermiszellen weisen eine besondere Regulation des Wachstums auf (s. 1.5.4), die durch ROPs und RICs gesteuert wird. Ob ähnliche Regulationsmechanismen in Wurzeln existieren, wurde bisher nicht untersucht. Für die Morphologie der Wurzelhaare scheint ROP6 jedoch von Bedeutung zu sein, wie Molendijk *et al.* (2001) zeigte. Die Expression von CA-AtROP6 in *Arabidopsis*-Wurzeln führt zu einer Delokalisation des Ca^{2+} -Gradienten an der Spitze des Wurzelhaares und zum Anschwellen des Wurzelhaares.

1. 8 Das Aktinzytoskelett und die Regulation der Aktin-Dynamik

Für Wachstumsprozesse, Zellteilung, Morphogenese, endo- und exozytotische Prozesse, aber auch für die Lokalisation von Auxintransportern und des Zellkerns in der Zelle ist die Dynamik des Aktinzytoskeletts eine wichtige Voraussetzung (Geldner *et al.*, 2001; Ketelaar *et al.*, 2002; Hussey *et al.*, 2006). Aktin liegt in der Zelle entweder als monomeres G-Aktin vor oder als Filament, aufgebaut aus G-Aktin-Monomeren. Das filamentöse (F)-Aktin besteht aus zwei Ketten polymerisierter und polar angeordneter G-Aktin-Monomere, die sich helixartig umeinanderwinden. Aktinfilamente sind keine stabilen Strukturen, sie unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau. Polymerisation und Depolymerisation von Aktin-Monomeren tritt an beiden Enden auf, jedoch erfolgt der Aufbau vor allem am schnell wachsenden plus-Ende, während das minus-Ende nur langsam oder gar nicht wächst. Aktin-Monomere liegen in der Zelle in ATP oder ADP-gebundener Form vor, wobei ATP-gebundene Monomere leichter polymerisieren (Ruijter und Emons, 1999). Aktinfilamente können auch zu höheren Strukturen angeordnet sein. Diese Aktinbündel bestehen aus parallel oder antiparallel dicht aneinander liegenden Aktinfilamenten.

1. 8. 1 Aktin-bindende Proteine

Für die Aktindynamik sind zahlreiche Aktin-bindende Proteine nötig. Zu diesen Aktin-bindenden Proteinen gehört Profilin, das an monomeres G-Aktin bindet und einen unkontrollierten Aufbau von Filamenten z. B. bei hohen Aktinkonzentrationen in der Zelle verhindert. Zu den Aktin-bindenden Proteinen gehören weiterhin der ARP2/3-Komplex (*actin related protein 2/3*), Formine, Gelsolin, das *heterodimeric capping protein*, ADF/Cofilin (ADF: *actin depolymerizing factor*), AIP1 (*actin interacting protein1*) und CAP (*cyclase associated protein*). Formine stimulieren die *de novo* Aktin-Polymerisation und können am plus-Ende binden (Thomas *et al.*, 2009). Sie interagieren mit Profilin und können vermutlich die Aktinpolymerisation an bestimmten Stellen der Zellmembran initiieren (Hussey *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2009). Gelsolin hingegen fördert die Aktinpolymerisation am minus-Ende, kann aber auch die Profilin-vermittelte Aktin-Depolymerisation verstärken. Das *heterodimeric capping protein* bindet fest an die plus-Enden von Aktinfilamenten, dadurch wird die Polymerisation am minus-Ende gefördert. Da das *capping protein* das plus-Ende besetzt und an Profilin gebundenes Aktin nur am plus-Ende binden kann, wird die Elongationsrate des Aktinfilaments stark verringert. ADF/Cofilin-Proteine binden monomeres G- und filamentöses (F)-Aktin pH-abhängig, sie verstärken die Aktindynamik durch Auflösen von Aktinfilamenten und fördern die Depolymerisation am plus-Ende. Durch Phosphorylierung nimmt die Aktivität der ADFs ab (Hussey *et al.*, 2006). Die Aktivität der ADFs wird durch zahlreiche Faktoren wie ROP-GTPasen beeinflusst (Chen *et al.*, 2003). Über die Funktionen von AIP1 ist bisher wenig bekannt, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass AIP1 die Aktivität von ADF1 in Lilien-Pollen extrem stimuliert (Allwood *et al.*,

2002). Das Protein AtCAP1 bindet an ADP- und ATP-gebundenes monomeres G-Aktin. AtCAP1 hemmt durch die Bindung an ATP-assoziiertes G-Aktin die Polymerisation zu Aktinfilamenten. AtCAP1 ist auch für den Nukleotid-Austausch von ADP mit ATP an den G-Aktin Monomeren verantwortlich, eine Funktion, die in tierischen Zellen von Profilinen übernommen wird und den Vorrat an polymerisierbaren G-Aktin wieder auffüllt (Chaudhry *et al.*, 2007).

1. 8. 2 Aktin-bündelnde Proteine

Pflanzen besitzen verschiedene Klassen Aktin-bündelnder Proteine: Villine/Gelsoline, Fimbrine, Formine, LIM-Proteine (Abb. 1. 4) (Thomas *et al.*, 2009) und den Elongationsfaktor-1 α (Hussey *et al.*, 2006). Diese Proteine sind für die Bildung höherer Strukturen wie Aktinkabel bzw. -bündel oder die Ausbildung von netzartigen Strukturen erforderlich.

Villine bündeln Aktinfilamente unipolar (Abb. 1. 5) und wirken einer Depolymerisation durch ADF/Cofilin entgegen (Hussey *et al.*, 2006). Die Aktivität verschiedener Villin-Isoformen kann vom Ca²⁺-Spiegel, Calmodulin-abhängig (Yokota *et al.*, 2000; 2003) oder -unabhängig sein (Huang *et al.*, 2005).

Fimbrine arbeiten unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration und schützen Aktinfilamente vor der Profilin-induzierten Depolymerisation (Hussey *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2009). Fimbrine besitzen zwei Aktin-bindende Domänen (Abb. 1. 4). Die zweite Aktin-bindende (ABD2)-Domäne wird, fusioniert an GFP, zur Visualisierung des Aktinzytoskeletts genutzt. Ein Modell von Galkin *et al.* (2008) schlägt vor, dass die Aktivierung der ersten Aktin-bindenden Domäne (ABD1) zur Bindung eines zweiten Aktinfilaments durch die Bindung von ABD2 an ein Aktinfilament ausgelöst wird (Abb. 1. 5). In *Arabidopsis* wurde bisher nur die Funktion von AtFIM1 näher charakterisiert. Die *atfim1*-mRNA wird in allen Pflanzenteilen exprimiert (McCurdy und Kim, 1998). Die Verknüpfung von Aktinfilamenten durch AtFIM1 ist unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration (Kovar *et al.*, 2000). Trotz zahlreicher Untersuchungen von AtFIM1 in verschiedenen Pflanzengeweben kann nicht belegt werden, dass eine Überexpression von AtFIM1 eine verstärkte Bildung von Aktinbündeln bewirkt (Thomas *et al.*, 2009).

Die multifunktionellen Formine wurden bereits bei den Aktin-bindenden Proteinen erwähnt. In *Arabidopsis* wurden mehr als 20 Formin-Isoformen gefunden, die den Klassen I und II zugeordnet werden. Formine der Klasse I besitzen vermutlich ein N-terminales Membran-Insertionssignal und eine transmembranale Region, die für eine Assoziation dieser Proteine mit der Membran sprechen (Abb. 1. 4). AtFH1 gehört zur Klasse I der Formine. AtFH1 kann am plus-Ende eines Aktinfilaments binden, Aktin-Polymerisationskeime bilden und Filamente zu längsgerichteten Strukturen verknüpfen (Abb. 1. 5) (Hussey *et al.*, 2006). Die Überexpression von AtFH1 führt zur übermäßigen Aktinkabel-Bildung an der Zellmembran

von Pollenschläuchen (Cheung und Wu, 2004). AtFH1 und andere Formine der Klasse I spielen möglicherweise eine Rolle bei der Bildung von Aktinbündeln an der Plasmamembran. Eine ähnliche Rolle könnte AtFH6 spielen. Die *atfh6*-mRNA wird durch Nematodenbefall verstärkt exprimiert. Die befallenen Zellen besitzen außergewöhnlich dicke, an der Plasmamembran lokalisierte Aktinbündel mit längsgerichteter und transversaler Orientierung, nicht infizierte Wurzelzellen zeigen vor allem längsgerichtete Aktinfilamente. AtFH6 ist vermutlich für die Bildung dieser Aktinbündel mit verantwortlich, die den für Plasmamembran- und Zellwandsynthese erforderlichen Vesikelverkehr koordinieren (Favery *et al.*, 2004). Die Überexpression von AtFH8 verursacht eine Zunahme des filamentösen Aktins in Wurzelhaaren und die vorzeitige Ausbildung von Aktinbündeln an der Spitze des Wurzelhaares. Die Überexpression von AtFH1 in Pollenschläuchen und AtFH8 in Wurzelhaaren führt zu ähnlichen morphologischen Defekten wie Anschwellen, Störung der Polarität und Wachstumsstillstand der Zellen (Hussey *et al.*, 2006; Staiger und Blanchoin, 2006; Thomas *et al.*, 2009).

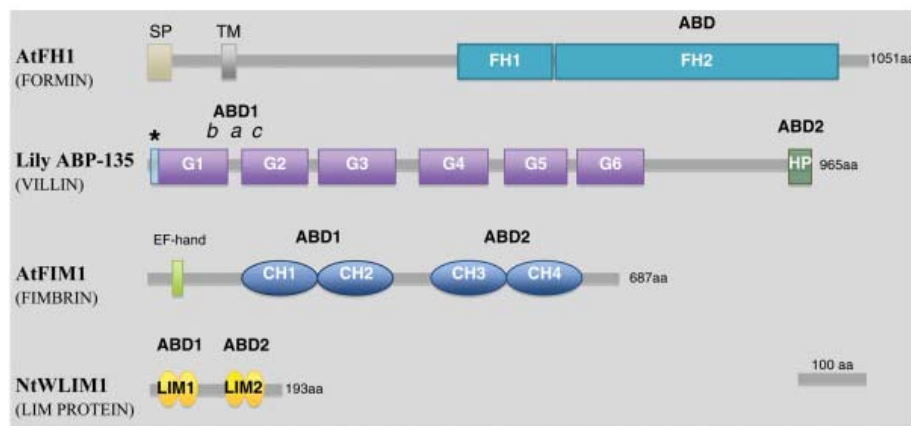


Abb. 1. 4: Organisation der Domänen von Aktin-bündelnden Proteinen in Pflanzen. AtFH1 besitzt 2 Formin-homologe Domänen (FH1 und FH2), ein Signalpeptid (SP) und eine transmembranale Domäne (TM). Lily ABP-135 weist die 6 Gelsolin-ähnlichen Domänen (G1-G6) und ein C-terminales *headpiece* (HP) auf, der Stern gibt den Ort einer potentiellen Dimerisierungsseite an. ABD1a steht für die Variante, das nur eine Aktin-bindende Domäne zwischen G1 und G2 existiert, alternativ dazu können 2 Aktin-bindende Domänen in G1 (ABD1b) und G2 (ABD1c) vorhanden sein. AtFIM1 besitzt 2 hintereinanderliegende Sequenzwiederholungen *Calponin*-homologer Domänen (CH1 und CH2 bzw. CH3 und CH4), sowie eine potentielle N-terminale Calcium-Bindestelle (*EF-hand*). NtWLIM1 besitzt 2 LIM-Domänen, die LIM-Domäne besteht aus hintereinanderliegenden Zinkfinger-Motiven. ABD: Aktinbindende Domäne, nach Thomas *et al.* (2009).

LIM-Proteine sind in tierischen Zellen an der Regulation verschiedener Prozesse wie der Genexpression oder der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt. In Tabak konnte WLIM1, ein Protein, das zwei LIM-Domänen aufweist, identifiziert werden. WLIM1 kann Aktinfilamente binden, stabilisieren und bündeln (Abb. 1. 4). Die beiden LIM-Domänen von WLIM1 können unabhängig voneinander an Aktinfilamente binden und diese bündeln

(Abb. 1. 5). Die Überexpression von WLIM1 führt zu einer gesteigerten Bildung von Aktinbündeln in Blattepidermiszellen von Tabak und BY2-Zellen (Thomas *et al.*, 2008, 2009). Ähnliche Effekte wurden bei der transienten Überexpression von LILIM1 in Lilien-Pollen gefunden. Die Überexpression von LILIM1 führt zu morphologischen Defekten, wie der Ausbildung mehrerer Pollenschläuche aus einem Pollenkorn. LILIM1 zeigt bei niedrigen pH-Werten und Ca^{2+} -Konzentrationen eine höhere Affinität für Aktinfilamente (Wang *et al.*, 2008).

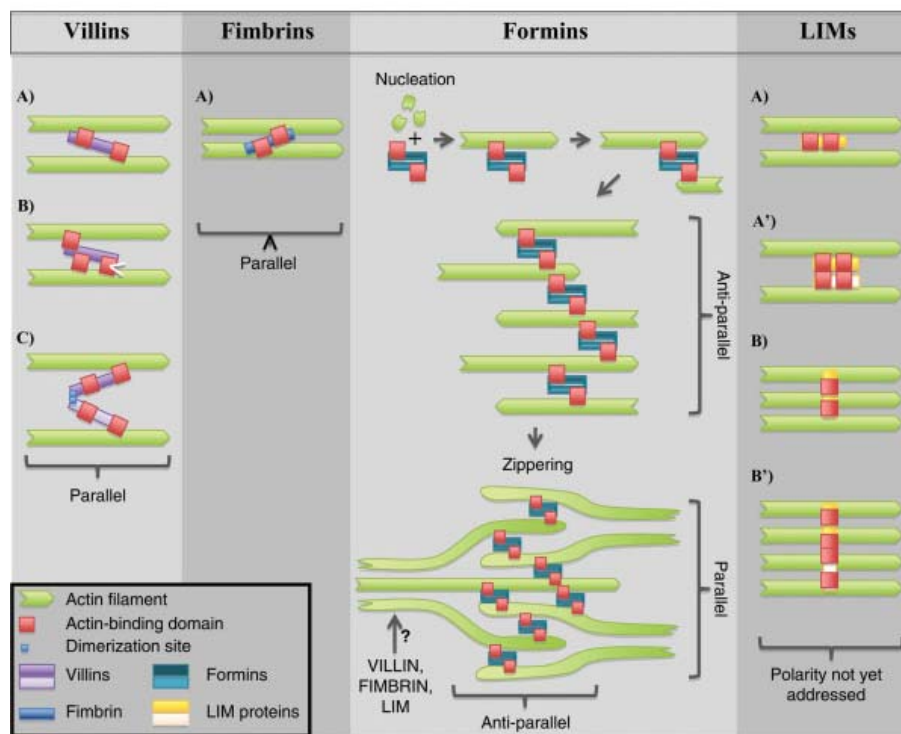


Abb. 1. 5: Modelle für die Bildung von Aktinbündeln für die verschiedenen Proteinfamilien mit Darstellung der Polarität der Aktinfilamente. Villine: A) Bildung von Aktinfilament-Bündeln durch die Domänen ABD1a (Villin core) und ABD2 (Villin headpiece). B) Bündelung von Aktinfilamenten durch ABD1b und ABD1c, durch ABD2 hält Villin am ersten Aktinfilament fest. C) Aktinfilament-Bündelung durch ABD2 und anschließende Villin-Dimerbildung. Fimbrine: feste Verknüpfung von Aktinfilamenten durch die beiden proximal gelegenen ABDs, Fimbrin-Dimerisierung ist nicht erforderlich. Formine: dieses Modell gilt für AtFH1. Nach der Bildung eines Polymerisationskerns wandert AtFH1 vom Ende des Aktinfilaments zur Seite und bildet ein neues Aktinfilament, dadurch kommt es zur Ausbildung antiparalleler Bündel. Nah gelegene, verlängerte Filamente zeigen die Tendenz miteinander zu interagieren und sich zu parallelen Bündeln zusammenzulagern, die durch weitere Aktin-bündelnde Proteine stabilisiert werden. LIM-Proteine: A) Beide LIM-Domänen verknüpfen ein Aktinfilamentpaar. A') Das gleiche Modell nach der Dimerisierung von LIM-Proteinen. B) Beide LIM-Domänen verknüpfen verschiedene Aktinfilamentpaare. B') Das gleiche Modell nach der Dimerisierung zweier LIM-Proteine (nach Thomas *et al.*, 2009).

Hussey *et al.* (2006) ordnen den Elongationsfaktor-1 α den Aktinfilament-bündelnden Proteinen zu. Der Elongationsfaktor-1 α hat neben der Bindung von Aminoacyl-tRNAs an die Ribosomen auch die Fähigkeit in Eukaryoten an Mikrotubuli und Aktinfilamente zu binden und diese zu bündeln. Bei niedrigen pH-Werten (6,5) bindet ZmEF-1 α aus Mais an Aktinfilamente und verhindert den Einbau von Aktin-Monomeren an beiden Enden. ZmEF-1 α bindet auch bei höheren pH-Werten an Aktin und bündelt es, was darauf schließen lässt, dass eine pH-Wert-unabhängige Domäne vorhanden ist. Die Aktivität von ZmEF-1 α wird durch ZmADF3 verstärkt beeinflusst und lässt auf eine Zusammenarbeit beider Proteine bei der Aktinzytoskelettregulation bei pH-Wert-Schwankungen schließen (Gungabissoon *et al.*, 2001).

1. 8. 3 Funktion und Regulation des ARP2/3-Komplexes

Der ARP2/3-Komplex stimuliert die Bildung neuer Aktinfilamente, indem er an vorhandene Filamente bindet und deren Verzweigung induziert. In tierischen Zellen führen zwei Signaltransduktionswege zur Aktivierung des ARP2/3-Komplexes durch RHO-GTPasen. Ein Weg führt über das Effektorprotein WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein), der andere über den pentameren WAVE-Komplex (WASP- und Verprolin-homologe-Proteine). In Pflanzen wurde bisher kein WASP-Protein gefunden. Die Komponenten des WAVE-Komplexes konnten jedoch identifiziert werden, drei dieser Proteine (PIR121, NAP1 und BRICK1/HSPC300) zeigen deutliche Sequenzübereinstimmungen zu den tierischen Proteinen, die Sequenzübereinstimmung für SCAR/WAVE (1 bis 4) und ABI (1 bis 4) liegt allerdings nur bei 10 % (Berken und Hülskamp, 2006; Hussey *et al.*, 2006). Der *Arabidopsis*-WAVE-Komplex wird vermutlich ebenso wie im tierischen System durch RHO-GTPasen (ROPs) aktiviert. Die Proteine PIR121 und das menschliche Homolog SRA-1 binden austauschbar und hochspezifisch an die aktiven Formen von tierischem RAC1 und ROP2 von *Arabidopsis* (Basu *et al.*, 2004). Das *Arabidopsis*-SCAR2-Protein ist ein Aktivator des ARP2/3-Komplexes von Vertebraten und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Mitglied des WAVE-Komplexes (Basu *et al.*, 2005). Die phänotypische Charakterisierung der *Arabidopsis*-Mutanten *spk1* (SPIKE = ROP-GEF, s. 1. 5. 1), *wave* und *arp2/3* sprechen für die Existenz eines SPK1-WAVE-ARP2/3 Signalweges. Die Charakterisierung der Doppelmutante *spk1sra1* (SRA1 = PIR121) und die Mutante *spk1* zeigen dieselben morphologischen Defekte, was darauf schließen lässt, dass sie im gleichen Signalweg auftreten und dieser Weg durch aktive ROP-GTPasen ausgelöst wird (Basu *et al.*, 2008).

Der ARP2/3-Komplex von *Arabidopsis* besteht aus 7 Untereinheiten, die Homologien zu den ARP2/3-Untereinheiten anderer Eukaryoten aufweisen. In *Arabidopsis* wurden sogenannte „*distorted mutants*“ gefunden, diese besitzen in den einzelnen Untereinheiten des ARP2/3-Komplexes Mutationen, was bspw. zu deformierten Trichomen führt (Deeks *et al.*, 2004). Aber auch die Morphologie der Wurzelhaare und Blattepidermiszellen wird durch Mutationen

im ARP2/3-Komplex beeinflusst (Hussey *et al.*, 2006). Ein funktionsfähiger ARP2/3-Komplex scheint für Pflanzen jedoch nicht so essentiell zu sein, wie für *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila* oder Säuger. Null-Mutanten in 5 Untereinheiten des ARP2/3-Komplexes führen zu verschiedenen Zellformdefekten, die Pflanzen sind dennoch lebens- und vermehrungsfähig (Hussey *et al.*, 2006; Berken und Hülskamp, 2006). Sogar der vollständige Verlust des F-Aktins hat weniger dramatische Auswirkungen als in tierischen Zellen oder Hefe. Auch ohne F-Aktin sind Pflanzenzellen zur Zellteilung, postembryonalen Entwicklung und Morphogenese fähig. Die Zellelongation ist jedoch stark F-Aktin-abhängig, so dass der Verlust des F-Aktins zu Zwergwuchs in *Arabidopsis* führt (Baluška *et al.*, 2001).

1. 9 Die Symbiose als Lebensgemeinschaft

Pflanzen sind in der Regel an einen festen Standort gebunden, dennoch können sie mit den verschiedensten Organismen interagieren. Eine besonders alte Beziehung stellt die Mykorrhiza dar. Bei der Mykorrhiza handelt es sich um eine mutualistische Symbiose zwischen Pflanzenwurzeln und Pilzen zu beiderseitigem Nutzen. Die Besiedelung des Landes vor ca. 460 Millionen Jahren durch Pflanzen wurde vermutlich erst durch die Ausbildung der Mykorrhiza ermöglicht, wodurch die Wahrscheinlichkeit bei Trockenheit und Nährstoffmangel zu überleben, deutlich stieg (Pirozynski und Malloch, 1975; Harrison, 2005). Mykorrhizapilze steigern die Aufnahmefähigkeit der Pflanze für Wasser und essentielle Elemente wie Phosphor und Stickstoff. Sie bieten außerdem Schutz vor pathogenen Pilzen und Nematoden. Im Gegenzug erhält der Pilz von der Pflanze Kohlenstoffverbindungen. Man unterscheidet zwei Mykorrhiza-Formen, die Ektomykorrhiza, bei der der Pilz die Wurzelzellen umhüllt und die Endomykorrhiza, bei welcher der Pilz in die Wurzelzellen eindringt. Die meisten Ektomykorrhizen werden mit Basidiomyceten, seltener auch mit Ascomyceten gebildet. Die Ektomykorrhiza ist oft hochspezifisch, d. h. eine bestimmte Baumart kann nur mit einer spezifischen Pilzart eine Mykorrhiza bilden.

Die Endomykorrhiza ist am weitesten verbreitet, sie tritt bei 80 % aller Gefäßpflanzenarten auf und ist meist unspezifisch. Die wichtigste Form der Endomykorrhiza ist die vesikulär-arbuskuläre (VA)-Mykorrhiza. VA-Pilze sind obligat biotroph und können ihren Lebenszyklus ohne einen Pflanzenpartner nicht vollenden. Alle VA-Pilze sind Mitglieder der Abteilung *Glomeromycota* (Harrison, 2005). Sonderformen der Endomykorrhiza stellen die Mykorrhizen der Orchidaceae und der Ericaceae dar.

Pflanzen können auch mit Bakterien in einer mutualistischen Beziehung vergesellschaftet sein, z. B. bilden Leguminosen mit Stickstoff-fixierenden Bakterien (zusammengefaßt zu Rhizobien) oder *Alnus sp.* mit der Stickstoff-fixierenden Gattung *Frankia* (Actinomyceten) Wurzelknöllchen aus. Für VA-Mykorrhizen und Wurzelknöllchen-bildende Bakterien scheint es ein gemeinsames Symbiose-Programm zu geben, das durch eine Anzahl von Genen, die für eine Interaktion der Organismen erforderlich sind, definiert wird. Zu diesen gemeinsamen

Symbiose-Genen gehören z. B. Rezeptorkinasen (SYMRK, DMI2, NORK), Kationenkanal-Proteine (CASTOR, POLLUX, DMI1) und eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase (CCaMK, DMI3). Die Abb. 1. 6. gibt einen Überblick über die konservierten genetischen Programme, die bei der Wurzelknöllchen-Symbiose mit Stickstoff-fixierenden Bakterien der Gruppe Rhizobia und der Gattung *Frankia* auftreten. Nur für die *Rhizobium-legume symbiosis* (RLS) sind bisher Gene bekannt, die für die Erkennung zwischen Pflanze und Pilz notwendig sind. Die rhizobiellen Nod-Faktoren werden durch LysM-Kinasen (NFRs) der Pflanzen erkannt. Pflanzen, die eine VA-Mykorrhiza oder eine Mykorrhiza mit Actinomyzeten ausbilden, besitzen vermutlich andere Gene für die Erkennung bakterieller und pilzlicher Signale. Bisher sind mindestens 7 Gene bekannt, die für die Endosymbiose von Pilzen und Bakterien mit Leguminosen (*Lotus japonicus*) nötig sind und möglicherweise auch in der VA-Mykorrhiza von Angiospermen konserviert auftreten. Die Rezeptorkinase SYMRK steht vermutlich am Beginn dieses Programms und ist auch für die Actinorhiza erforderlich. In der RLS und in der VA-Mykorrhiza treten spezifische Änderungen des Ca^{2+} -Spiegels durch die intrazelluläre Infektion auf, dadurch werden vermutlich nachgeschaltete Signalwege aktiviert. Während der RLS führt die Aktivierung des Symbiose-Programms wahrscheinlich zur Aktivierung der Cytokinin-Synthese in der Pflanze. Der Cytokinin-Rezeptor LHK1 (CRE in *M. truncatula*) spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung der Wurzelknöllchen-Ausbildung. In der Leguminose *L. japonicus*, ist die kontinuierliche Signalgebung durch die fortschreitende intrazelluläre Infektion (evtl. durch Cytokinin) für den Erhalt und die vollständige Ausbildung der Wurzelknöllchen notwendig. Cytokinin spielt auch bei der Induktion der Seitenwurzeln eine Rolle (LR: *lateral root*). Die Ausbildung von Seitenwurzeln weist strukturelle Ähnlichkeit mit Actinorhiza-Knöllchen auf. So führt ein relativer Anstieg des kortikalen Cytokinins zu unterschiedlichen Reaktionsmustern: die Knöllchenbildung wird induziert, die Ausbildung von Seitenwurzeln hingegen wird unterdrückt.

In der Nicht-Symbiose Pflanze *Arabidopsis* wurden die drei Histidin-Kinasen AtLHK1, AtLHK2 und AtLHK3 als mögliche orthologe Kinasen zu LjLHK1 untersucht. AtLHK1, AtLHK2 und AtLHK3 sind in die Ausbildung von Seitenwurzeln involviert (Abb. 1. 6) (Markmann und Parniske, 2009).

Die Beziehung zwischen Pflanze und Symbiont kann ihren mutualistischen Charakter verlieren, wenn der Symbiont sich beispielsweise übermäßig ausbreitet oder die Pflanze in eine Mangelsituation gerät. Dann kommt es zur Aktivierung von Abwehrmaßnahmen gegen den Symbionten, was zum Auftreten von Krankheitssymptomen an der Pflanze und zum Ausschluß des ehemaligen Partners führen kann (Kogel *et al.*, 2006; Zhao und Qi, 2008; Oelmüller *et al.*, 2009). Es ist bekannt, dass Pflanzen bei der Erkennung von Pathogenen und Symbionten teilweise ähnliche Gene/Gengruppen aktivieren. Dies ist ein Hinweis auf eine gemeinsame Entwicklung während der Evolution. Pflanzen erkennen pathogene und symbiotische Mikroorganismen durch die Wahrnehmung von sogenannten *Pathogen-Assoziierten Molekularen Mustern* (*pathogen-associated molecular patterns*: PAMPs) durch

extrazelluläre Rezeptor-ähnliche Kinasen (RLKs). Die Erkennung von Flagellin durch den Rezeptor AtFLS2 in *Arabidopsis* löst in der Zelle eine Reaktion aus, die als PAMP-triggered immunity (PTI) bezeichnet wird (Jones und Dangl, 2006). Dieser Prozess findet über die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade statt und löst die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus, die zur PAMP-triggered immunity-Reaktion der Pflanze führen. Entscheidend für eine erfolgreiche Besiedelung und Ausbreitung von Symbiont oder Pathogen ist die Abgabe von spezifischen Effektoren, die ein Überwinden der Immunität der Pflanze ermöglichen (Zhao und Qi, 2008).

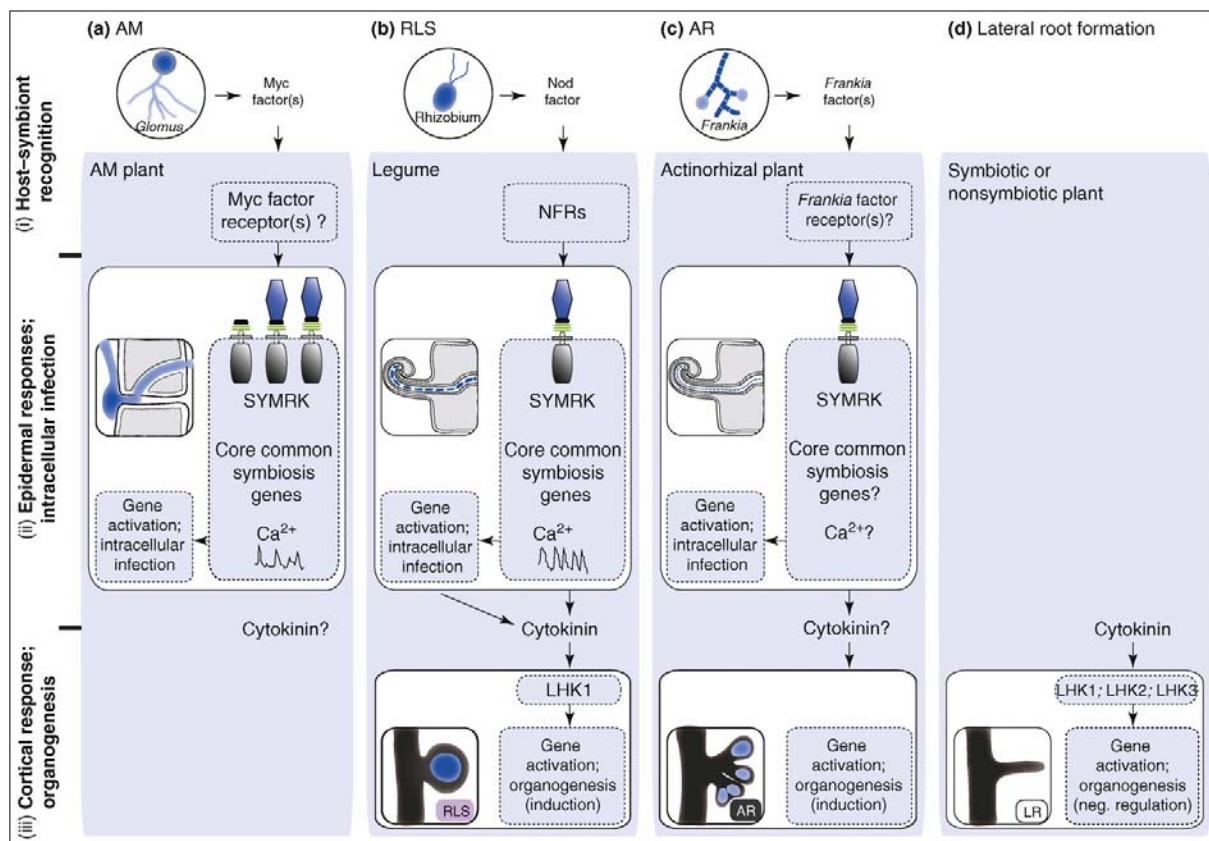


Abb. 1. 6: Die Ausbildung einer Wurzelknöllchen-Symbiose mit Stickstoff-fixierenden Bakterien der Gruppe *Rhizobia* und der Gattung *Frankia* weist konservierte genetische Programme auf. Die für eine intrazelluläre Infektion erforderlichen Gene a) einer arbuskulären Mykorrhiza (AM), b) einer Rhizobium-Leguminosens Symbiose (RLS) und c) einer Symbiose mit Frankia (AR: Aktinorhiza). d) Die Ausbildung von Wurzelknöllchen zeigt Ähnlichkeit mit der Ausbildung von Seitenwurzeln (LR: lateral root). (nach Markmann und Parniske, 2009)

1. 9. 1 *Piriformospora indica*

P. indica wird auf Grund phylogenetischer Analysen auf rDNA (ribosomale DNA)-Basis der Ordnung *Sebacinales* zugeordnet (Selosse *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2004). Die *Sebacinales* gehören zu den basalen Hymenomyzeten (Basidiomyzeten). Sie sind weltweit verbreitet und weisen zahlreiche bekannte mykorrhizabildende Pilze auf, die z. B. Orchidaceae, Lebermoose, Pinaceae und Ericaceae besiedeln (Weiss *et al.*, 2004).

P. indica ist ein endophytisch lebender Pilz, der in der indischen Thar-Wüste entdeckt wurde und die verschiedensten Pflanzenarten besiedeln kann, dazu gehören z. B. *Arabidopsis*, (Pěskan-Berghöfer *et al.*, 2004), Gerste und Weizen (Waller *et al.*, 2005, Baltruschat *et al.*, 2008), Tabak, Mais, Petersilie (Varma *et al.*, 1999), Bäume wie die Pappel (Kaldorf *et al.*, 2005) und Orchideen (Varma *et al.*, 1999). Die Interaktion von *P. indica* mit Arten aus zahlreichen Pflanzenfamilien legt die Vermutung nahe, dass es sich um eine sehr ursprüngliche Form der Interaktion handelt. *P. indica* lebt, wie viele Mykorrhiza-Pilze, mit Bakterien in einer Gemeinschaft zusammen (Frey-Klett *et al.*, 2007). Es handelt sich dabei um das α -Proteobakterium *Rhizobium radiobacter* (Sharma *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu VA-Pilzen kann *P. indica* leicht in sterilen Kulturen ohne eine Wirtspflanze kultiviert werden. Er bildet asexuelle Chlamydosporen mit 8-25 Kernen in den Wurzelzellen und auf der Wurzeloberfläche, sexuelle Stadien wurden bisher nicht nachgewiesen (Verma *et al.*, 1998; Varma *et al.*, 1999). *P. indica* besiedelt ausschließlich Pflanzenwurzeln und wächst dort inter- und intrazellulär im Bereich der Wurzelrinde (Varma *et al.*, 1999).

Die Besiedelung der Pflanze durch *P. indica* führt zu einer Zunahme der Biomasse, des Saatguts (Pěskan-Berghöfer *et al.*, 2004; Shahollari *et al.*, 2005). Der Pilz kann z. B. in Gerste (*Hordeum vulgare*) die Resistenz gegen das Wurzelpathogen *Fusarium culmorum* stimulieren oder die systemische Resistenz von Gerste gegen *Blumeria graminis* und gegen *Golovinomyces orontii* in *Arabidopsis* induzieren (Waller *et al.*, 2005; Deshmukh *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2008). *P. indica* kann die Pflanze auch vor abiotischem Stress, wie hohen Salzkonzentrationen oder Trockenheit schützen (Waller *et al.*, 2005; Sherameti *et al.*, 2008a; Baltruschat *et al.*, 2008; Vadassery *et al.*, 2009b). Eine Inokulation von *P. indica* führt in Stecklingen von *Pelargonium x hortorum* und *Euphorbia pulcherrima* zu einer größeren Anzahl und Länge von Adventivwurzeln noch bevor der Pilz physischen Kontakt zu den Pflanzen aufgenommen hat (Druege *et al.*, 2007).

Die Interaktion mit *P. indica* führt zu einer Abnahme der Verfügbarkeit von Kohlenstoff- und Stickstoff-Assimilaten in den Wurzeln der Gerste (Schäfer *et al.*, 2009). Die Kultivierung mit dem Pilz wirkt sich positiv auf die Aufnahme von Phosphat (Shahollari *et al.*, 2005) in *Arabidopsis* und auf die Aufnahme von Nitrat in Tabak und *Arabidopsis* aus (Sherameti *et al.*, 2005). Wird *P. indica* mit den Wurzeln der Gerste kultiviert, wirkt sich dies auf die Regulation der Genexpression aus. Die größte Gruppe der durch *P. indica* regulierten Gene bilden Stress-assoziierte Gene. Zahlreiche Gene der Signaltransduktion, des Sekundär-Metabolismus und der Proteinbiosynthese werden ebenfalls reguliert. Der Pilz greift auch in

den Phytohormonhaushalt der Pflanze ein. Das betrifft vor allem Auxin, ABA und Gibberellin (Schäfer *et al.*, 2009). *P. indica* produziert geringe Mengen Auxin, dies führt in der Beziehung mit *Arabidopsis* jedoch nicht zu einer Veränderung der Auxin-Konzentration in der Pflanze. Ebenso wenig wird die Expression Auxin-regulierter Gene in kolonisierten Wurzeln verändert. Das Phytohormon Cytokinin produziert der Pilz in relativ großen Konzentrationen. Cytokinin-regulierte Gene werden in kolonisierten *Arabidopsis*-Wurzeln differentiell exprimiert. In kolonisierten Wurzeln sind erhöhte Cytokinin-Konzentrationen der auch im Pilz vorkommenden Isomere *iP* und *cZ*-Cytokinin, nachweisbar. Werden die Cytokinin-Rezeptoren CRE1 und AHK2 inaktiviert, bleibt der wachstumsfördernde Effekt aus, so dass anzunehmen ist, dass die Rezeptorkombination CRE1/AHK2 für die Interaktion eine Rolle spielt (Vadassery *et al.*, 2008).

1. 9. 2 Molekulare Mechanismen der Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica*

Die Modellpflanze *Arabidopsis* gehört zur Familie der *Brassicaceae*, einer der wenigen Familien, die normalerweise keine Mykorrhizen ausbildet. Dennoch kann *Arabidopsis* mit *P. indica* interagieren und ermöglicht dadurch die molekulare Analyse pflanzlicher Gene, die für diese Beziehung von Bedeutung sind und möglicherweise auch Auskunft über die Evolution von Symbiose-Genen geben können.

Binden mikrobielle Effektoren an einen spezifischen Rezeptor, ist eine der ersten Reaktionen der Pflanzenzelle die Änderung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels, der durch den Einstrom von Ca^{2+} aus Speicherkompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum, der Vakuole oder dem extrazellulären Raum bedingt ist. Kalzium ist ein bedeutender *second messenger* in der pflanzlichen Signaltransduktion, der durch zahlreiche biotische und abiotische Signale aktiviert wird (Sanders *et al.*, 2002). Eine spezifische Ca^{2+} -Signatur tritt auch bei der VA-Mykorrhiza und in der Rhizobien-Leguminosen-Interaktion auf (Markmann und Parniske, 2009). Ein aus *P. indica* isolierter Zellwandextrakt führt u. a. zu einem schnellen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in *Arabidopsis*-Wurzeln, zu einer Veränderung der Genexpression und der Aktivierung von MAP-Kinasen (Vadassery *et al.*, 2009a).

Von Bedeutung für die Interaktion von *P. indica* mit *Arabidopsis* ist auch die β -Glukosidase PYK10, die vermutlich eine übermäßige Besiedelung der Wurzeln durch den Pilz verhindert und dadurch eine Abwehrreaktion unterdrückt (Sherameti *et al.*, 2008b). Die Kultivierung mit dem Pilz führt zu einer verstärkten Expression und Modifikation eines MATH-Domänen aufweisenden Proteins (*meprin and TRAF* [tumor necrosis factor receptor associated factor] *homology*) (Pěškan-Berghöfer *et al.*, 2004). Diese transiente Modifikation tritt auf, bevor der Pilz und die Pflanze physischen Kontakt zueinander haben (Oelmüller *et al.*, 2005). Zwei weitere Proteine, die für die Interaktion eine Rolle spielen, sind LRR1 und LRR2. Beide Proteine weisen *leucine-rich repeat*-Motive auf und sind in *lipid rafts* und in Plasmamembran-Mikrodomänen von *Arabidopsis*-Wurzeln lokalisiert. Die mRNA von *lrr1*

wird im frühen Stadium der Interaktion durch *P. indica* hochreguliert. Die Inaktivierung von LRR2 führt dazu, dass die verstärkte Expression von *lrr1* und die Wachstumsförderung durch den Pilz ausbleiben (Shahollari *et al.*, 2005; 2007).

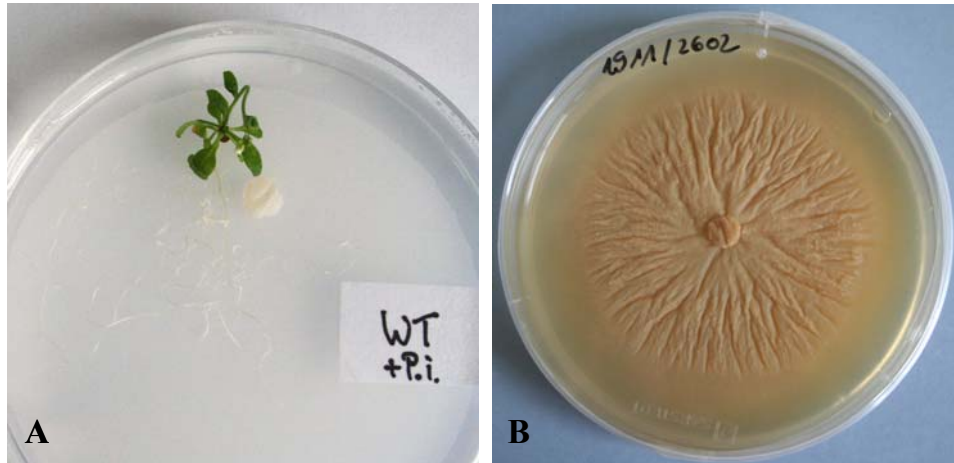


Abb. 1. 7: Kultivierung des *Arabidopsis*-Wildtyps mit *P. indica* (A) und das Wachstum des Pilzes (B). A: Der *Arabidopsis*-Wildtyp wurde für 14 Tage gemeinsam mit *P. indica* auf PNM-Medium kultiviert. B: Ein 5 mm großes Stück von *P. indica* (in der Bildmitte) diente zur Anzucht des Pilzes auf Kaefers-Medium. Das Bild zeigt den Pilz nach einer Kultivierungszeit von 3 Wochen.

1. 10 Zielsetzung

Die Interaktion des endophytisch lebenden Pilzes *Piriformospora indica* mit der Modellpflanze *Arabidopsis* fördert das Pflanzenwachstum und ermöglicht die molekulare Analyse von Genen, die für die Ausbildung dieser symbiotischen Beziehung von Bedeutung sind.

Der erfolgreichen Besiedelung von *Arabidopsis* durch *P. indica* geht eine Rezeptor-vermittelte Erkennung pilzlicher Botenstoffe voraus. Über den möglichen Rezeptor und die anschließende Weiterleitung des Signals, die zur Aktivierung genetischer Programme führt und so über die Ausbildung einer symbiotischen Beziehung oder einer Abwehrreaktion entscheidet, ist bisher wenig bekannt. Den kleinen G-Proteinen kommt in der pflanzlichen Signaltransduktion eine bedeutende Rolle zu. Eine Familie der kleinen G-Proteine, die ROP-Familie, kontrolliert eine Vielzahl von lebenswichtigen Signalwegen im Lebenszyklus einer Pflanze. ROP-Proteine stehen vermutlich mit Rezeptorkinasen in engem Kontakt und könnten daher an der Weiterleitung des eingehenden Pilz-Signals direkt beteiligt sein. Auf Grund der Vermutung, dass ROP1 und/oder ROP6 für die Ausbildung einer symbiotischen Beziehung zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* eine Bedeutung haben, wurden die folgenden Ziele gesetzt:

1. Es sollte festgestellt werden, ob die *knock-out*-Mutation bzw. die Überexpression von *rop1* und *rop6* zu einer veränderten Reaktion auf den Pilz führt. Daher sollten homozygote *rop1*- und *rop6-knock-out*-Mutanten sowie *rop1*- und *rop6*-Überexpressionsmutanten hergestellt und in Interaktions-Experimenten mit *P. indica* getestet werden.
2. Es sollte untersucht werden, ob ROP1 und ROP6 redundante Funktionen aufweisen, da dies für einige ROP-Proteine für das Wurzelhaar- und das Pollenschlauchwachstum vermutet wird. Dafür sollte eine *rop1rop6*-Doppelmutante erzeugt und ebenfalls in Interaktions-Experimenten mit dem Pilz untersucht werden.
3. RIC4 ist ein bekannter Effektor von ROP1. Es sollte festgestellt werden, ob RIC4 für die Beziehung von *Arabidopsis* zu *P. indica* von Bedeutung ist. Dafür sollte eine *ric4-knock-out*-Mutante hergestellt und in Interaktions-Experimenten getestet werden.
4. Die Erkennung eines Pilz-Signals führt in Pflanzen zur Veränderung der Genexpression. Es sollte untersucht werden, ob die *P. indica* induzierte Veränderung der Genexpression Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den *rop-knock-out*-Mutanten aufweist.
5. ROP-Proteine sind an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt. Da es beim Befall durch Pathogene in Pflanzenzellen zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts kommt, sollte untersucht werden, ob *P. indica* in *Arabidopsis* ebenfalls eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts auslöst und ob diese Reaktion in den *rop-knock-out*-Mutanten verändert ist.
6. Der aus *P. indica* isolierte Zellwandextrakt führt in *Arabidopsis*-Wurzeln zu einer transienten Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels. Da ROP-Proteine wahrscheinlich an der Regulation des Ca^{2+} -Spiegels während des Pollenschlauch- und Wurzelhaarwachstums beteiligt sind, sollte untersucht werden, ob diese Reaktion auf *P. indica* auch in *rop-knock-out*-Mutanten vorhanden ist.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav:	Varioklav [®] (H+P Labortechnik, München)
Brutwärmeschrank:	Tritec [®] t (Tritec [®] , Hannover)
Digitalkamera:	Canon EOS 350D
Elektrotransformationsgerät:	Easyject EQUIBIO (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Geldokumentation:	DeVisionG (Decon Science Tec GmbH, Hohengandern)
Gelelektrophorese:	Biometra Power Pack P25 (Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)
Luminometer:	Luminoscan Ascent (Thermo Electron corporation, Waltham, MA, USA)
Mikroskope:	Leitz BIOMED (Mikrovid GmbH, Arnsberg) LEICA MZ6 (Leica, Wetzlar) Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena) Axiovert 200M mit ApoTome (Carl Zeiss, Jena)
PCR-Maschinen:	Primus ⁹⁶ plus (MWG-Biotech AG, Ebersberg) Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
Photometer:	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
<i>real-time</i> PCR-Gerät:	MX3000P (Stratagene La Jolla, CA, USA)
Schüttler:	Inkubator Shaker (New Brunswick Scientific CO., NJ, USA) GFL 3015 (Burgwedel)
Sequenziergerät:	LI-COR 4200 (Biosciences GmbH, Bad Homburg)
Thermomixer:	Eppendorf Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg)
Tisch-Thermostat:	Eppendorf ThermoStat plus (Eppendorf, Hamburg)
Vakuumkonzentrator:	Savant SPD 111V (GMI, Ramsey, MN, USA)
Waagen:	BP 161P, BP 610 (Sartorius, Göttingen)
Wasseranlage:	Milli-Q RG (Firma Millipore, Schwalbach)
Zentrifugen:	HERMLE Z 300K (HERMLE, Wehingen) Eppendorf Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

2. 1. 2 Chemikalien

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden Materialien und Chemikalien von besonders hoher Reinheit verwendet. Coelenterazin wurde von der PJK-GmbH aus Kleinblittersdorf bezogen. Chemikalien in p. a. Qualität wurden von den folgenden Firmen verwendet.

Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
 Carl Roth GmbH, Karlsruhe
 Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
 Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
 SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
 PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

2 .1. 3 Enzyme

DNase	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
RNase	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
T4-DNA Ligase	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot

2. 1. 4 Kits und Fertigreagentien

CycleReader TM Auto DNA Sequencing Kit	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
GeneJET TM Plasmid Miniprep Kit	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
iQ SYBR Green Super Mix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Omniscript [®] Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden
pCR [®] /GW/TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pGEM [®] -T Vektor System	Promega GmbH, Mannheim
Qiaex [®] II Gel Extraktionskit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy [®] Plant Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden

2. 1. 5 Molekulare Marker

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
λ DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> (verdaut)	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
peqGOLD Leiter-Mix	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

2. 1. 6 Nukleotide und Oligonukleotide

Nukleotide:

dNTP-Set	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
----------	---------------------------------------

Oligonukleotide:

Oligonukleotide zur reversen Transkription der mRNA:

Oligo(dT) ₁₈ Primer	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
--------------------------------	---------------------------------------

Alle weiteren verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Oligonukleotide zur Analyse der T-DNA-Insertionslinien und für RT-PCR

Bezeichnung	Sequenz
LBa1	5'-TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G-3'
T-DNA fw.	5'-GAG ACG GGC AAC AGC TGA TTG CCC TTC-3'
T-DNA rev.	5'-TCT CCA CTG ACG TAA GGG ATG ACG CAC-3'
LP-ROP1	5'- ATG AGC GCT TCG AGG TTC GTA AAG-3'
RP-ROP1	5'-TCA TAG AAT GGA GCA TGC CTT CTG-3'
LP-ROP2	5'-ATG GCG TCA AGG TTT ATA AAG TGT G-3'
RP-ROP2	5'-TCA CAA GAA CGC GCA ACG GTT C-3'
LP-ROP3	5'-ATG AGC GCT TCG AGG TTC ATA AAG-3'
RP-ROP3	5'-TTA CAA AAT GGA GCA GGC TTT TTG-3'
LP-ROP4	5'-ATG AGT GCT TCG AGG TTT ATA-3'
RP-ROP4	5'-TCA CAA GAA CAC GCA GCG GT-3'
LP-ROP6	5'-ATG AGT GCT TCA AGG TTT ATC-3'
RP-ROP6	5'-TCA GAG TAT AGA ACA ACC TTT C-3'
LP-ROP10	5'-ATG GCT TCG AGT GCT TCA AAA T-3'
RP-ROP10	5'-TCA ATT CTT CCC ACA CAG AAT G-3'
LP-RIC3	5'-ATG GCG ACC GTG AAA GGC CTT C-3'
RP-RIC3	5'-TTA CTC TTT GTC ACT GAT ATT AT-3'
LP-RIC4	5'-TTA TAA AGT TGG ATG AAG ATG AGG G-3'
RP-RIC4	5'-ATG AGA GAT AGA ATG GAG AGA CTT G-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz
M13 IRD700	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
M13 IRD800	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'
M13 uni (-21)	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
M13 rev (-29)	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'
GW1	5'-GTT GCA ACA AAT TGA TGAGCA ATG C-3'

Oligonukleotide für den Vektor pB2GW7,0

pB2GW7-fwd	5'-GCA CTA GTG ATA TCA CAA GTT TG-3'
------------	--------------------------------------

Oligonukleotide für die *real-time* PCR

Bezeichnung	Sequenz
ACT2 fw	5'-GCT GGA TTT GCA GGA GAT GAT GCT C- 3'
ACT2 rev	5'-CAC ACC ATC ACC AGA ATC CAG CAC- 3'
At1g02930-FP	5'-CCT TCT CTC AAC TGG CAA GG- 3'
At1g02930-RP	5'-GAG CAG AAG GCC TTG AAG TG- 3'
LP-Calmodulin-RT	5'-CAA GAT CCT GGA TTT GTC GTA AC- 3'
RP-Calmodulin-RT	5'-CGT TCT CAT CCT CCT CGT TAT TC- 3'
LP-Chitinase-RT	5'- ATG CGG CCT TGG CTG GTC CAT C- 3'
RP-Chitinase-RT	5'- ATA TGG CTA CTG TGG TAC GAC CG- 3'
LP-Germin RT	5'-GCT TCG GAC CCA AGC TCT CTT CAG- 3'
RP-Germin RT	5'-CAA GAC CTC GGA GGC ACG TGG GT- 3'
GapC-RP	5'-CAA GGC AGT TAG TGG TGC AGC TA- 3'
GapC-RT-RP	5'- CTT CAA GTG AGC TGC AGC CTT GTC- 3'
GapC-LP	5'- CTA GAG TTG TTC TCC AGA GGG AC- 3'
LP-GST16b	5'-CTT CCA CCA GGA GAG TCC TCA T- 3'
RP-GST16	5'- GTA TTC CAA TGG ACA TGA TTG CAT- 3'
LP-Profilin	5'- CGC TAT CGT TGG TCA TGA CGG- 3'
RP-Profilin	5'- CCA TGT TGC ACT GTC CTG GTG- 3'
LP-Trypsin-RT	5'-ATG GCA AAG GCT ATC GTT TCC ATC- 3'
RP-Trypsin-RT	5'-CTG TGG AGT ATC GTC GCA GAA G- 3'
ROP1-RT-RP	5'-CCA GGC GCG TAA TGT TTC AAC TC- 3'
LP-ROP1	5'- ATG AGC GCT TCG AGG TTC GTA AAG- 3'
ROP2-LP-RT	5'-GGT GTT GCC ATT ATC CTT GTT G- 3'
RP-ROP2	5'-TCA CAA GAA CGC GCA ACG GTT C- 3'
LP-ROP3	5'-ATG AGC GCT TCG AGG TTC ATA AAG- 3'
ROP3-RP-RT	5'-GGA GAC ATT CTC ATA ACT AGC C- 3'
ROP6-RT-LP	5'-GTC TTC TCA TCT CCT ACA CTA GC- 3'

ROP6-RT-RP	5'- GGA GCA TAA TGT CTC AGT TCA GG- 3'
ROP11-LP-RT	5'-GAG TTC CCC TTG TCC TTG TTG G- 3'
RP-ROP11	5'-TCA ATG CCG AGT CAC TAT CCT- 3'
RIC2-LP-RT	5'-CAA CGG TGC TAA TAT CTC AGA TGG T- 3'
RP-RIC2	5'-TCA GAC GAC GGT GCC GGT GAG- 3'
RIC4-LP-RT	5'-CGT TCG TTG GAA CTC CTA TCT C- 3'
RP-RIC4	5'-ATG AGA GAT AGA ATG GAG AGA CTT G- 3'

Oligonukleotide für den Nachweis von Apoaquorin (pMAQ2) in *Arabidopsis*

Bezeichnung	Sequenz
AEQ-fwd	5'-ATG AAA TAT GGT GTG GAA ACT GAT T- 3'
AEQ-rev	5'-GTT GTC TTG TCA TCT CAT CAA CAT C- 3'

2. 1. 7 Bakterienstämme, Vektoren und Klone

Agrobacterium tumefaciens GV3101/pMP90

<i>E. coli</i> DH5 α (Hanahan, 1983)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Bullock <i>et al.</i> , 1987)	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>E. coli</i> NovaBlue	Novagen, Darmstadt

Vektoren

pENTR TM (Gateway [®] entry vector)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pB2GW7,0	Plant Systems Biology, Ghent, Belgien
pGEM [®] -T-Vektor	Promega GmbH, Mannheim

2. 1. 8 Standardmedien und Lösungen

Hoagland-Medium:	1,6 g/l Hoagland Salze, 10 g/l Saccharose, 0,5 g/l MES, 10 g/l Agar, pH 5,7
LB:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0
LB-Agar:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0, 1,5 % (w/v) Agar
Kaefers-Medium:	20 g/l Glukose, 2 g/l Pepton, 1 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Caseinhydrolysat, 50 ml Makroelementlösung, 10 ml Spurenelementlösung, 1 ml Fe-EDTA-Lösung, 1 ml Vitaminlösung; für Festmedium 15 g/l Agar, pH 6,5
Fe-EDTA-Lösung:	0,556 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O in 50 ml H ₂ O und 0,744 g EDTA in 50 ml H ₂ O lösen, beide Lösungen auf 60 °C erwärmen, unter Rühren mischen

Makroelementlösung:	12 g/l NaNO ₃ , 10,4 g/l KCl, 10,4 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 30,4 g/l KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung:	2,2 g/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 1,1 g/l Borsäure, 0,5 g/l MnSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,16 g/l CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 0,16 g/l CoCl ₂ x 5 H ₂ O, 0,11 g/l Ammonium-molybdat
Vitaminlösung:	0,1 g/l Thiamin, 0,04 g/l Glycin, 0,01 g/l Nikotinsäure, 0,01 g/l Pyridoxin
PNM-Medium:	5 mM KNO ₃ , 2 mM MgSO ₄ , 2 mM Ca(NO ₃) ₂ , 0,01 µM FeSO ₄ , 70 µM H ₃ BO ₃ , 14 µM MnCl ₂ , 0,5 µM CuSO ₄ , 1 µM ZnSO ₄ , 0,2 µM Na ₂ MoO ₄ , 0,01 µM CoCl ₂ , 10,5 g/l Agar, pH 5,6
SOC-Medium:	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 10 ml/l KCl (0,25 M), 5 ml/l MgCl ₂ (2 M), 20 ml/l Glucose (1 M), pH 7,0
YEB-Medium:	5 g/l Rinderextrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose, 1 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O (pH 7,2)
DNA-Lyse-Puffer:	220,42 g/l Harnstoff, 17,54 g/l NaCl, 6,06 g/l Tris (pH 8,0), 10 g/l Laurylsarcosin, 7,44 g/l EDTA, pH 8,0
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	
Phenol:	250 g Phenol (Festsubstanz) im Wasserbad bei 65 °C lösen, 0,5 M Tris HCl (pH 8,0), 0,1 % Hydroxychinolin, 0,2 % Merkaptoethanol zugeben
5 x TBE:	54 g/l Tris, 27,5 g/l Borsäure, 4,65 g/l EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)
Tris-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

2. 1. 9 Pflanzenmaterial

Für die Experimente wurde *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia (Col-0) verwendet. Die mit dem GFP-FABD2-Konstrukt (Ketelaar *et al.*, 2004) stabil transformierte *Arabidopsis*-Linie wurde uns von Dr. F. Baluška (Bonn) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten T-DNA-Insertionslinien wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen (Alonso *et al.*, 2003). Es wurden die Linien SALK_015799, SALK_091737 und SALK_075913 untersucht. Die mit dem Expressionsvektor pMAQ2 transformierte *Arabidopsis*-Linie, welche eine einfache Insertion des Apoproteins Aequorin besitzt, erhielten wir von Dr. M. Knight (Knight *et al.*, 1991).

2. 2 Methoden

2. 2. 1. Kultivierung und Transformation von Bakterien

2. 2. 1. 1 Kultivierung und Transformation von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium oder auf Agarplatten bei 37 °C über Nacht im Brutschrank. Es wurden Antibiotika als Selektionsmarker (Sambrook und Russell, 2001) verwendet. Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach Hanahan (1983) hergestellt. Die Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen erfolgte durch Hitzeschock (Hanahan, 1983).

2. 2. 1. 2 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pMP90 erfolgte zunächst als Vorkultur in 5 ml YEB-Medium für 24 h bei 28 °C und 200 Upm auf einem Schüttler. Für die Hauptkultur wurden 500 ml YEB-Medium mit der Vorkultur beimpft und unter den genannten Bedingungen inkubiert. *A. tumefaciens* GV3101/pMP90 besitzt eine Resistenz gegen die Antibiotika Rifampicin und Gentamicin. Es wurden 50 mg/l Rifampicin und 25 mg/l Gentamicin zum YEB-Medium gegeben. Für die Anzucht der transformierten *A. tumefaciens*-Zellen wurden dem YEB-Medium 10 mg/l Spectinomycin zugegeben.

2. 2. 1. 3 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* GV3101/pMP90-Zellen

2 ml YEB-Medium zuzüglich der Antibiotika Gentamicin (50 µg/ml) und Rifampicin (10 µg/ml) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C unter Schütteln (250 Upm) angezogen. Mit dieser Vorkultur wurde eine 200 ml Hauptkultur angesetzt und ebenfalls unter Schütteln (250 Upm) inkubiert bis eine optische Dichte von 0,3 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 Upm sedimentiert. Das Pellet wurde durch Zugabe von 20 ml eiskaltem 1 mM HEPES-Puffer (pH 7) gelöst. Nach anschließendem Zentrifugieren wurden die Zellen noch zweimal mit 20 ml eiskaltem 1 mM HEPES-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml sterilem, eiskaltem Glycerin (10 %) aufgenommen, auf 40 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

2. 2. 1. 4 Transformation kompetenter *A. tumefaciens* GV3101/pMP90-Zellen

Die kompetenten Bakterienzellen, YEB-Medium und Plasmid-DNA wurden auf Eis gelagert. 600 ng Plasmid-DNA (s. 2. 2. 11. 1) wurde zu den kompetenten Zellen pipettiert. Die DNA-Zellsuspension wurde in eine vorgekühlte Küvette (2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 15 μ Farrad und 2500 V. Sofort nach der Transformation erfolgte die Zugabe von 500 μ l YEB-Medium in die Küvette. Die transformierten Zellen wurden in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 28 °C für 2-4 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je 200 μ l der transformierten Zellen auf LB-Selektionsplatten mit 50 mg/l Rifampicin, 25 mg/l Gentamicin und 10 mg/l Spectinomycin ausplattiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 28 °C erschienen Kolonien transformierter Bakterien.

2. 2. 2 Kultivierung von *Arabidopsis*

Die Anzucht von *Arabidopsis* zur Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten und zur Vorbereitung der Interaktionsexperimente mit *P. indica* erfolgte zunächst auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) zuzüglich 13,4 g/l Saccharose. Für die Selektion der transformierten Keimlinge der Überexprimierer OX-rop1 und OX-rop6 wurde dem Medium Phosphinothricin (10 mg/ml) zugegeben. Für die Sterilisation des Saatgutes wurde dieses zunächst in einer Lösung aus 1 ml *A. dest.*, 500 μ l Klorix und 65 μ l Laurylsarcosin für 8 min unter Schütteln sterilisiert und anschließend 7 mal mit *A. dest.* gewaschen und auf den MS-Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation im Dunkeln für 48 h bei 4 °C wurde die Kultivierung unter Dauerweißlicht von 100 μ mol m⁻² s⁻¹ bei 22 °C fortgesetzt. Zur Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten wurden die Keimlinge nach ca. 18 Tagen auf Erde in Multiplatten mit Aracons umgesetzt und unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife kultiviert.

2. 2. 3 Kultivierung von *P. indica*

Für die Kultivierung auf Platten mit Kaefers-Medium (KM) wurde ein d = 5 mm großes Stück des Pilzes auf eine neue Petrischale überimpft und bei 28 °C für 3-4 Wochen im Dunkeln inkubiert. Für Flüssigkulturen wurde ein gleichfalls 5 mm großes Stück des Pilzes in einem Erlenmeyerkolben mit 500 ml Medium für ca. 3 Wochen in einem Schüttel-Inkubator unter Lichtausschluss bei 25 °C und 100 Upm kultiviert.

2. 2. 4 Interaktionsexperimente von *Arabidopsis* mit *P. indica*

Für Experimente in Petrischalen wurden die Samen zunächst wie beschrieben auf MS-Medium für 9 Tage kultiviert (2 Tage bei 4 °C im Dunkeln, 7 Tage Dauerweißlicht von $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 22 °C). Die Keimlinge wurden anschließend auf Platten (d = 90 mm) mit PNM-Medium umgesetzt. Auf diese PNM-Platten wurde zuvor eine Nylonmembran gelegt (Maschengröße: 70 μm), um ein Einwachsen der Pflanzenwurzeln in das Medium zu verhindern. Im Abstand von 1 cm wurde ein 5 mm großes Stück des Pilzes neben die Pflanzenwurzel gelegt. Die Kultivierung erfolgte im Dauerlicht ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 22 °C. Das Pflanzenmaterial wurde nach 2, 4, 6, 10 und 14 Tagen geerntet. Spross und Wurzel wurden getrennt gewogen und für weitere Experimente, wenn nötig, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Für Interaktionsexperimente auf Erde wurde *Arabidopsis* für 18 Tage auf MS-Medium vorkultiviert und anschließend in Töpfe (d = 8 cm) mit sterilisierter Erde umgesetzt. Es wurden Pflanzen mit und ohne den Zusatz von Pilzmyzel kultiviert. Das Pilzmyzel wurde wie beschrieben in Flüssigkultur angezogen und nach 3 Wochen geerntet. Durch anschließendes Waschen mit *A. dest.* wurden Reste des Mediums entfernt. In jeden Topf mit Erde wurden 5 g Pilzmyzel direkt unter die Erde gemischt. Die Kultivierung erfolgte für 2 Wochen im Kurztag und anschließend bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen. Das Experiment wurde zweimal mit je 15 Kontrollpflanzen und 15 mit Pilz infizierten Pflanzen für jede Linie durchgeführt.

2. 2. 5 Isolation von Nukleinsäuren

2. 2. 5. 1 Isolation von DNA aus *Arabidopsis*

Zwei frisch geerntete Blätter wurden mit 500 μl Lysis-Puffer versetzt und homogenisiert. Nach einer Inkubation für 5 min bei 37 °C, erfolgte die Zugabe von 500 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol. Die Proben wurden nach kräftigem Schütteln für 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 14000 Upm wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet zweimal mit 500 μl Ethanol (80 %) gewaschen. Das Pellet wurde nach kurzem Trocknen in der Speed Vac in 20 μl TE gelöst, 30 min auf Eis und anschließend 10 min bei 50 °C inkubiert. Die Zugabe von 1 μl RNase diente dem Abbau von RNA-Kontaminationen.

2. 2. 5. 2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde entweder nach Birnboim und Doly (1979) oder nach dem Protokoll des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits durchgeführt.

2. 2. 5. 3 Isolation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*

Für die Isolation der Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* wurde der QIAprep® Spin Miniprep Kit mit einem veränderten Protokoll verwendet. Es wurden 10 ml YEB-Medium (zzgl. 50 mg/l Rifampicin, 25 mg/l Gentamicin und 10 mg/l Spectinomycin) mit einer transformierten Kolonie angeimpft und für ca. 24 h bei 28 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3500 Upm für 45 min wurde das Pellet in 250 µl P1-Puffer vollständig gelöst. Nach Zugabe von 500 µl P2-Puffer wurde die Probe durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach dem Zupipettieren von 700 µl P3-Puffer wurde die Probe durch 5-maliges Umschwenken sofort gemischt. Es folgten 10 min Zentrifugation bei 13000 Upm. Die Säule aus dem QIAprep® Spin Miniprep Kit wurde in ein 2 ml Sammelgefäß gesteckt. Auf diese Säule wurde anschließend der Überstand aus der Zentrifugation pipettiert und für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und auf die Säule wurden 500 µl PB-Puffer pipettiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und der Durchfluss verworfen. Es folgte die Zugabe von 750 µl PE-Puffer und ein weiterer Zentrifugationsschritt. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert und anschließend in ein neues Sammelgefäß gestellt. Die Plasmid-DNA wurde nach Zugabe von 50 µl EB-Puffer und 1 min Inkubation bei Raumtemperatur aus der Säule durch Zentrifugation bei 13000 Upm eluiert.

2. 2. 5. 4 Isolation von RNA aus Pflanzen

Für die Isolation von RNA aus T-DNA-Insertionslinien und den Überexpressionsmutanten von *Arabidopsis* wurde Trizol der Firma PEQLAB verwendet. Das bei -80 °C tiefgefrorene Pflanzenmaterial (100 mg Blatt- oder Wurzelmaterial) wurde gemörsert und anschließend mit 1 ml Trizol-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Probe für 15 s kräftig geschüttelt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur folgten 5 min Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C. Die in der oberen Phase befindliche RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur und 10 min zentrifugieren bei 12000 g und 4 °C. Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 20 µl H₂O_{DEPC} gelöst. Zur vollständigen Resuspendierung der RNA schließt sich eine Inkubation bei 55 °C für 10 min an.

Für die Isolation von RNA für *real-time* PCR, RT-PCR und *microarray*-Experimente wurde der RNeasy Plant Mini Kit verwendet. Die Durchführung der RNA-Isolation erfolgte nach den Anweisungen des Protokolls. Für die RNA-Isolation wurden jeweils 100 mg bei -80 °C eingefrorenes Wurzelmaterial verwendet. In den RNA-Isolationsprozess integrierte sich ein On-Column DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set. Die Qualität der RNA wurde photometrisch (OD 260/280 nm) oder auf einem denaturierenden RNA-Gel bestimmt.

2. 2. 5. 5 Synthese von cDNA für RT-PCR und *real-time* PCR

Die Synthese von cDNA aus 1 µg RNA wurde mit dem Omniscript® Reverse Transcription Kit nach den Angaben des Herstellers ausgeführt.

2. 2. 5. 6 RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Transkriptmenge für die Gene *rop1* (*At3g51300*), *rop6* (*At4g35020*) bzw. *ric4* (*At5g16490*) in den T-DNA-Insertionslinien, den Überexpressionslinien, den GFP-FABD2-Linien, den pMAQ2-Linien und in der Doppelmutante *rop1rop6* bestimmt. Als externe Standards wurden *actin2* (*At3g18780*) und *gapC* (*At3g04120*) verwendet. Für einen 10 µl PCR-Ansatz wurde 1 µl cDNA eingesetzt. Die PCR wurde nach folgendem Programm ausgeführt: 1 x 2 min bei 95 °C, 20-35x (30 s bei 95 °C, 40 s bei 55-60 °C, 40-50 s bei 72 °C), 1 x (10 min bei 72 °C).

2. 2. 5. 7 Amplifikation von DNA mit PCR

Aus den *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien, Überexpressionslinien, den GFP-FABD2-Linien, den pMAQ2-Linien und der Doppelmutante *rop1rop6* isolierte DNA wurde auf das Vorhandensein der jeweiligen Gene *rop1*, *rop6* bzw. *ric4* mit PCR geprüft. Dafür wurde der T-DNA-spezifische Primer LBa1 und der entsprechende genspezifische Primer verwendet. Das PCR-Programm lautete wie folgt: 1 x 4 min 94 °C, 30-33 x (20 s bei 94 °C, 20 s bei 53-60 °C, 60 s bei 72 °C), 1x 8 min bei 72 °C).

2. 2. 5. 8 Trennung und Dokumentation von DNA-Fragmenten auf dem Agarosegel

Für die Auftrennung der DNA wurde ein 1 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (1,25 µg/ml Gellösung) verwendet. Die Fragmentgröße wurde mit einem Größenstandard bestimmt. Die Dokumentation erfolgte mit der DeVisionG-Software.

2. 2. 5. 9 *real-time* PCR

Mit der *real-time* PCR wurde die Expression von Genen untersucht, die in den *microarrays* eine deutliche Regulation aufwiesen bzw. bekannte Interaktionspartner der kleinen G-Proteine sind. Neben dem Wildtyp und der Doppelmutante *rop1rop6* wurden auch die Mutanten *rop1* und *rop6* untersucht, um eine Aussage treffen zu können, ob *rop1* oder *rop6* einen größeren Einfluss auf die Expression der jeweiligen Gene hat.

Die *real-time* PCR wurde mit dem MX3000P-Cycler von Stratagene durchgeführt. Die *real-time* PCR besteht wie eine PCR aus einem Denaturierungsschritt, bei dem sich die DNA-Templatestränge trennen, einem Anlagerungsschritt, bei dem der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA bindet und einem Elongationsschritt, bei dem die hitzestabile *Taq*-Polymerase die Primer verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt (Saiki *et al.*, 1988). Die Vervielfältigung der DNA verläuft zumindest theoretisch zunächst exponentiell. Gegen Ende der PCR-Reaktion verringert sich die Vermehrungsrate durch störende Produkte wie Pyrophosphat oder rehybridisierte DNA. Für die *real-time* PCR wurde der fluoreszierende Farbstoff SYBR[®] Green I verwendet. Dieser bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA. Wird der an doppelsträngige DNA gebundene Fluoreszenzfarbstoff angeregt, kommt es zu einer verstärkten Fluoreszenzemission. Am Ende jedes PCR-Zyklus wird diese Fluoreszenzemission gemessen und ermöglicht so eine Aussage der gebildeten Produktmenge zu einem bestimmten Zeitpunkt. Als Maß für die Quantifizierung der DNA dient der CP (*Crossing Point*). Zu diesem Zeitpunkt hebt sich das Fluoreszenzsignal gerade vom Hintergrund ab und die Vermehrung der DNA ist bei diesen niedrigen Zyklenzahlen noch exponentiell. Da die DNA-Konzentrationen in den Proben verschieden sein können, z. B. durch unterschiedliche Effizienz der cDNA-Synthese, wurde ein Referenzgen, welches von den Zellen konstitutiv exprimiert wird, mit quantifiziert. Als *housekeeping gene* wurde *gapC* ausgewählt, da *actin2* in den durchgeführten *microarrays* Hinweise auf eine Regulation zeigte. Durch die Verwendung von *gapC* als Kontrollgen ist eine Normalisierung der Expressionsergebnisse möglich. Die Berechnung der Expression der Testgene im Wildtyp und in den Mutanten erfolgte nach Pfaffl (2001) mit folgender Formel:

$$\frac{2^{-(Ct \text{ Wildtyp Testgen} - Ct \text{ Mutante Testgen})}}{2^{-(Ct \text{ Wildtyp Kontrollgen} - Ct \text{ Mutante Kontrollgen})}} = \text{Expressionsverhältnis}$$

Die Zahl 2 steht für eine optimale *real-time* PCR Effizienz, d. h. eine Verdopplung der DNA in jedem Zyklus. Im optimalen Fall haben die Kontrollgene in Wildtyp und Mutante die gleichen CPs, wodurch der Nenner gleich eins würde und das berechnete Verhältnis wäre dann nur von den Expressionsunterschieden des Testgens abhängig.

Durchführung

Die für die *real-time* PCR verwendeten cDNAs und Primer wurden zunächst mit einer RT-PCR auf ihre Qualität untersucht. Die verwendete cDNA stammte aus drei unabhängigen Wachstumskinetiken.

Folgender Ansatz wurde für die *real-time* PCR verwendet:

H ₂ O	6,5 µl
Reaktionsmix	12,5 µl
Primer 1	1,0 µl
Primer 2	1,0 µl
cDNA	4,0 µl

Die synthetisierte cDNA wurde nach der reversen Transkription so verdünnt, dass für die *real-time* PCR eine cDNA entsprechend 50 ng RNA zum Einsatz kam.

Die *real-time* PCR wurde nach folgendem Programm ausgeführt: 1 x 2 min bei 95 °C, 40 x (30 s bei 94 °C, 60 s bei 58 °C, 40 s bei 72 °C), 1 x (10 min bei 72 °C). Daran schließt sich die Erstellung einer Schmelzkurve an. Diese gibt Auskunft über die Qualität des PCR-Produkts, z. B. evtl. vorhandene Primerdimere. Test- und Kontrollgen wurden in Dreifachbestimmungen analysiert, außerdem wurde für jedes Primerpaar eine Negativkontrolle mitgeführt, d. h. im Reaktionsansatz befand sich H₂O anstelle von cDNA.

2. 2. 6 Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten

Um die exakte Insertion der T-DNA im Gen zu lokalisieren, wurde das mittels T-DNA- und genspezifischem Primern erhaltene PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5 %) und nach dem Ausschneiden der Bande aus dem Gel mit dem Qiaex[®] II Gel Extraktionskit eluiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in den pGEM[®]-T Vektor lt. Protokoll kloniert und in kompetente *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock transformiert (s. 2. 2. 1. 1). Für die Selektion der Transformanten wurden LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Platten verwendet (s. pGEM[®]-T Vektor-Protokoll). Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden einige weiße Kolonien in je 3 ml LB für eine Plasmidisolation angezogen. Die Plasmidisolation wurde nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (1979) ausgeführt.

2. 2. 7 DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977)

Die isolierten Plasmide aus 2. 2. 6 wurden unter Verwendung des CycleReaderTM Auto DNA Sequencing Kits mit dem LI-COR 4200 sequenziert. Für die Auswertung kam die LI-COR e-SeqTM Software zum Einsatz (Biosciences GmbH, Bad Homburg).

2. 2. 8 Herstellung der Doppelmutante *rop1rop6*

Homozygote Mutanten für die Gene *rop1* bzw. *rop6* wurden für die Kreuzungen verwendet. Die *rop6*-Mutanten dienten als Pollenspender. Als Pollenempfänger dienten Blüten von *rop1*-Mutanten, die noch geschlossen waren, deren Kronblätter aber unter den Kelchblättern sichtbar herausragten. Nach der vollständigen Entfernung der Staub- und Kronblätter am Pollenempfänger mittels Pinzette unter dem Mikroskop erfolgte die Bestäubung durch Pollen eines reifen Staubblattes von *rop6*-Mutanten. Die bestäubte Blüte wurde markiert und benachbarte Knospen entfernt. Das Ernten des Saatguts erfolgte kurz vor dem Öffnen der reifen Schote. Die Anzucht der Pflanzen aus der F₁- und F₂-Generation, DNA-Isolation und PCR zur Identifizierung der Mutanten erfolgte wie unter 2. 2. 2; 2. 2. 5. 1 und 2. 2. 5. 7 beschrieben. Das Saatgut der homozygoten *rop1rop6*-Mutanten wurde für die weiteren Experimente verwendet.

2. 2. 8. 1 Herstellung der *Arabidopsis*-GFP-FABD2 *rop1*-, *rop6*- und *rop1rop6*-Linien

Für die Kreuzungen wurde die mit dem GFP-FABD2 Fusionsprotein (Voigt *et al.*, 2005) stabil transformierte *Arabidopsis*-Linie und die Mutante *rop1rop6* verwendet. Die Identifizierung der Mutanten erfolgte wie unter 2. 2. 7 beschrieben. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit dem Axiovert 135 überprüft.

2. 2. 8. 2 Herstellung der *Arabidopsis*-pMAQ2 *rop1*-, *rop6*- und *rop1rop6*-Linien

Die mit dem Expressionsvektor pMAQ2 transformierte *Arabidopsis*-Linie wurde mit der Linie *rop1rop6* gekreuzt. Das Vorhandensein der *Apoaequorin*-Plasmidsequenz wurde mit den Primern AEQ-fwd und AEQ-rev kontrolliert.

2. 2. 9 Isolation des Zellwandextraktes aus *P. indica*

Der Zellwandextrakt wurde nach dem Protokoll von Anderson-Prouty und Albersheim (1975) mit den genannten Änderungen (Vadassery *et al.*, 2009a) isoliert.

2. 2. 10 Ca²⁺-Messungen

Die Kultivierung der transgenen Pflanzen *rop1*, *rop6* und *rop1rop6*, die das *Apoaequorin*-Gen enthalten, erfolgte auf Hoagland-Medium. Nach 48 h Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Platten aufrecht im Dauerweißlicht (100 µmol m⁻² s⁻¹ bei 22 °C) für 14 Tage kultiviert.

Für die Vorbereitung der Ca^{2+} -Messungen wurden die Wurzeln unter sterilen Bedingungen vom Spross getrennt. Die Wurzeln wurden über Nacht in $15\ \mu\text{M}$ Coelenterazin in $5\ \text{ml}\ \text{H}_2\text{O}$ in einer Petrischale ($d = 50\ \text{mm}$) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Da für den Ablauf der Reaktion O_2 benötigt wird, muss Luftzutritt gewährleistet sein. Je 4-6 Wurzeln werden in ein *well* einer 96-*well*-Platte überführt, in das $100\ \mu\text{l}\ \text{H}_2\text{O}/15\ \mu\text{M}$ Coelenterazin-Lösung vorgelegt wurden. Für die Kontrollen wurde H_2O verwendet. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die Messung mit dem Luminoscan Ascent-Luminometer gestartet. Die Messung der Biolumineszenz erfolgte für 20 min in Intervallen von 5 s. Aufgezeichnet wurden die Daten als *relative light units* (RLUs). Die Messung der Grundlumineszenz betrug eine Minute. Anschließend wurden $50\ \mu\text{l}$ Zellwandextrakt direkt in ein *well* gegeben und die Biolumineszenz für 20 min gemessen. Die Entladung des noch vorliegenden Aequorins wurde durch Zugabe von $0,1\ \text{M}\ \text{CaCl}_2$ zzgl. $10\ \%$ Ethanol ausgelöst und für 10 min gemessen. Die Berechnung der Biolumineszenz wurde nach Rentel und Knight (2004) ausgeführt. Dabei wird die Konzentration des frei in der Zelle vorhandenen Ca^{2+} in Beziehung zu dem Ca^{2+} gesetzt, das am Ende der Messung durch die Entladung des Aequorins freigesetzt wird. Die Berechnung erfolgt nach der folgenden Formel: $\text{pCa} = 0,332588 (-\log k) + 5,5593$. Die Konstante k ergibt sich aus dem Quotienten der Zahl der Lumineszenz pro Sekunde und der Zahl der noch vorhandenen Gesamt-Lumineszenz.

2. 2. 11 Herstellung der *Arabidopsis* Überexprimierer OX-rop1 und OX-rop6

2. 2. 11. 1 Herstellung der Überexpressionsplasmide pOX-rop1 und pOX-rop6

Für die Herstellung der Überexprimierer OX-rop1 und OX-rop6 wurde der pCR®/GW/TOPO® TA Cloning® Kit von Invitrogen verwendet, welcher auf der Gateway™ Technologie basiert. Grundlage der Gateway™ Technologie ist die Fähigkeit des Bakteriophagen λ zur Seiten-spezifischen Rekombination (Landy, 1989). Zunächst wird das PCR-Produkt in einen *entry*-Vektor (pENTR™) kloniert. Dieser Vektor liegt auf Grund der Aktivität der aus *Vaccinia* isolierten *Topoisomerase I*, welche eine spezifische DNA-Sequenz (CCCTT) der doppelsträngigen DNA erkennt und schneidet, linearisiert vor (Shuman, 1994). Der linearisierte Vektor besitzt einfache 3'-Deoxythymidin (T)-Überhänge. Da der Vektor zwei gegenüberliegende Schnittstellen enthält, werden beide Schnittstellen durch die *Topoisomerase I* blockiert und eine Selbstligation verhindert. Die TOPO® Cloning Reaktion und die LR-Reaktion wurden nach dem Protokoll des pCR®/GW/TOPO® TA Cloning® Kit ausgeführt. Im folgenden Text werden Abweichungen bzw. zusätzliche Informationen zur Durchführung beschrieben. Die PCR-Produkte der Gene *rop1* und *rop6* wurden mit einem Mix aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase hergestellt. Es wurde die vollständige cDNA-Sequenz beider Gene eingesetzt. Für die Klonierung in den *entry*-Vektor ist die Verwendung der *Taq*-Polymerase notwendig, da diese durch ihre terminale Transferase-Aktivität einfache Deoxyadenosin (A)-Überhänge synthetisiert und so eine direkte Ligation in den Vektor

ermöglicht. Nach einer Ligation für 5 min wurde das Plasmid durch Hitzeschock in kompetente TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Spectinomycin (100 µg/ml)-haltigen LB-Platten. Nach der Kultivierung über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurden 10 Kolonien in je 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin angeimpft und über Nacht unter Schütteln angezogen. Für die Plasmidisolation wurde der GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit verwendet. Die Insertion der DNA wurde durch Restriktion überprüft. Für die Sequenzierung wurde der GW1-Primer benutzt. Das DNA-Insert im pENTR™-Vektor wird von den benachbarten Rekombinationseiten *attL* und *attR* eingeschlossen. Diese Rekombinationseiten ermöglichen die Seiten-spezifische Rekombination vermittelt durch den Gateway® LR Clonase™ II Enzym-Mix in einen Expressionsvektor mit den kompatiblen Rekombinationseiten *attB* und *attP*. Als Expressionsvektor wurde pB2GW7,0 verwendet (Karimi *et al.*, 2002). Für die LR-Reaktion wurden die pENTR™-Klone pERop1 und pERop6 zunächst mittels der Restriktionsendonuklease *AvaII* in der für die Spectinomycin-Resistenz kodierenden Region geschnitten und aus dem Gel mit dem Qiaex® II Gel Extraktionskit eluiert. 150 ng des linearisierten Plasmids wurden für die LR-Reaktion eingesetzt. 1 µl der LR-Reaktion wurde für die Transformation durch Hitzeschock in kompetente *E. coli* Nova Blue-Zellen verwendet. Nach Inkubation der Transformanten über Nacht bei 37 °C auf LB-Selektivmedium mit Spectinomycin (100 µg/ml) wurden 10 Kolonien in je 3 ml LB zzgl. 100 µg/ml Spectinomycin angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Für die Plasmidisolation wurde der GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit verwendet. Der Erfolg der Klonierung wurde in einer PCR mit dem pB2GW7-Fwd-Primer und den genspezifischen Primern RP-ROP1 bzw. RP-ROP6 überprüft und anschließend mit den genspezifischen Primern LP-ROP1 und RP-ROP1 bzw. LP-ROP6 und RP-ROP6 sequenziert.

2. 2. 11. 2 Transformation von *Arabidopsis* mit den Überexpressionsplasmiden pOX-rop1 und pOX-rop6

Die Anzucht der mit den Plasmiden pOX-rop1 und pOX-rop6 transformierten *A. tumefaciens*-Zellen erfolgte wie unter 2. 2. 1. 2 beschrieben. Die Zellen wurden durch Abzentrifugieren für 10 min bei 2000 g geerntet. Das Pellet wurde in 300 ml einer 5 %-igen Saccharoselösung vorsichtig resuspendiert. Die Konzentration der Bakterienzellen sollte eine OD₆₀₀ von 0,8-1,0 aufweisen. Direkt vor dem Eintauchen der ungeöffneten Blüten wurde der Infiltrationslösung das Detergenz SilwetL-77 zugesetzt (0,05 %).

Die Transformation von *Arabidopsis* wurde nach der leicht veränderten *floral dip*-Methode von Clough und Bent (1998) durchgeführt. Die Pflanzen wurden ca. 4-6 Wochen kultiviert, bis sie reichlich Knospen angesetzt hatten. Bereits geöffnete Blüten oder vorhandene Schoten wurden 1-2 Tage vor der Transformation entfernt. Zwei Stunden vor der Transformation wurden die Pflanzen gründlich gewässert. Der Spross wurde in das Infiltrationsmedium

getaucht und für ca. 30 s hin und her bewegt. Nach der Transformation wurden die Pflanzen in Plastikschaalen gelegt, die mit angefeuchtetem Papier ausgekleidet waren. Die Schalen wurden abgedeckt, um Lichtzutritt zu verhindern. Am Folgetag wurden die Pflanzen mit Wasser besprüht und aufrecht im Langtag weiter kultiviert. Nach dem Abblühen wurden die Pflanzen in Schalen gelegt, bis sie vollständig abgereift waren. Das Saatgut wurde geerntet und auf Erde in Platten ausgesät. Die Samen wurden zunächst 2 Tage im Dunkeln bei 4 °C vernalisiert und anschließend im Kurztag kultiviert. Die Keimlinge wurden im Alter von ca. 5 Tagen mit einer 0,1 % Phosphinothricin-Lösung (Basta®) besprüht, nach weiteren 3 Tagen wurde dieser Vorgang wiederholt. Resistente Keimlinge sind nach einer Woche erkennbar. Das Saatgut der resistenten Pflanzen wurde auf MS-Medium mit 10 mg/ml Phosphinothricin ausplattiert und für weitere Experimente verwendet.

2. 2. 12 Analyse der Keimung von *Arabidopsis* und den Mutanten *rop1*, *rop6*, *rop1rop6*, *ric4*, pOX-*rop1* und pOX-*rop6*

Die Samen vom *Arabidopsis*-Wildtyp und den Mutanten *rop1*, *rop6*, *rop1rop6*, *ric4*, pOX-*rop1* und pOX-*rop6* wurden wie in 2. 2. 2 beschrieben, auf MS-Medium kultiviert. Nach 24 h im Dauerweißlicht ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 22 °C) wurde die Anzahl der gekeimten Samen mit dem LEICA MZ6-Mikroskop festgestellt. Der sichtbare Austritt der Keimlingswurzel wurde als Keimung gewertet. Nach 3 Tagen wurde die Anzahl der insgesamt gekeimten Samen untersucht.

2. 2. 13 Untersuchung des Aktinzytoskeletts von *Arabidopsis*-GFP-FABD2 und den *Arabidopsis*-GFP-FABD2 *rop1*-, *rop6*-, *rop1rop6*-Mutanten

Grundlage für die Visualisierung des F-Aktins in *Arabidopsis* ist das GFP-FABD2-Konstrukt (Voigt *et al.*, 2005). Dieses Konstrukt besteht aus einer N-terminalen Fusion von GFP an die C-terminale Sequenz von AtFim1. AtFim1 (Aminosäuren 325-687) besteht aus der zweiten Aktin-bindenden Domäne und dem C-terminalen Ende von Fimbrin1 aus *Arabidopsis*.

Für die Untersuchung des Aktinzytoskeletts wurden die GFP-FABD2-*rop1*-, *rop6*-, *rop1rop6*-Linien und der *Arabidopsis*-GFP-FABD2-Wildtyp mit und ohne *P. indica* wie in 2. 2. 4 beschrieben kultiviert. Nach 2, 6 und 17 Tagen wurden die Wurzeln mikroskopiert. Dafür kam das Axiovert 200M mit ApoTome zum Einsatz. In der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie besteht ein Bild aus Signalbeiträgen, die nicht nur aus der Objektebene selbst, sondern auch aus darüber bzw. darunter liegenden Strukturen des Präparates stammen. Dadurch kann es zur Aufhellung des Bilduntergrundes kommen, und der Kontrast der Abbildung wird reduziert. Das ApoTome ermöglicht überstrahlungsfreie optische Schnitte durch Streifenprojektion. Dabei wird im ApoTome Modus eine

Gitterstruktur in die Ebene der Leuchtfeldblende des Fluoreszenz-Strahlengangs gelegt. Die Position des Gitters wandert durch das Präparat und in jeder Gitterposition werden 3 Rohbilder aufgenommen, die zu einem Ergebnisbild verrechnet werden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte automatisch über die Digitalkamera AxioCam (Zeiss). Die AxioVision-Software von Zeiss steuert die Aufnahme und Auswertung der Bilder nach den Anweisungen des Anwenders. Die AxioVision-Software ermittelt u. a. automatisch die Vergrößerung des Objekts und ermöglicht 3D-Rekonstruktionen.

2. 2. 14 Färbemethoden für die Lichtmikroskopie zum Nachweis von *P. indica*-Sporen und ROS im *Arabidopsis*-Wildtyp, *rop1*-, *rop6*-, *rop1rop6*-, *OX-rop1*-, *OX-rop6*- und *ric4*-Mutanten

Zur Vorbereitung der Pflanzenwurzeln für die Färbung mit dem Pianese-Farbgemisch, Säurefuchsin und Pelikanblau-Essigsäure (5 %) wurden die Wurzeln nach Kultivierung auf PNM-Medium (s. 2. 2. 4) für 10 min in KOH (10 %) und nach Kultivierung in Erde für 30 bis 60 min in KOH (10 %) bei 90 °C entfärbt und anschließend 3fach mit *A. dest.* gewaschen.

Pianese-Färbung

1 g Pianese-Farbgemisch (0,5 g Malachitgrün, 0,5 g Säurefuchsin, 0,01 g Martiusgelb) wurde in 150 ml *A. dest.* zzgl. 50 ml Ethanol (92 %, unvergällt) gelöst.

Die entfärbten Wurzeln wurden für mindestens 45 min in der Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Wurzeln für 1 min in Essig-Ethanol (99 ml Ethanol 92 %ig, 1 ml Eisessig) überführt und anschließend kurz in Ethanol (92 %) gespült. Zum Mikroskopieren wurde Ethanol (70 %) verwendet. Durch die Färbung sollten die Pflanzenzellen grün und die Pilzzellen rosa gefärbt sein.

Säurefuchsin-Färbung (0,01 % Säurefuchsin in Milchsäure)

Die entfärbten Wurzeln wurden für 10 min in der Färbelösung bei 90 °C inkubiert und anschließend mehrmals in *A. dest.* gewaschen und in Leitungswasser mikroskopiert.

Tintenblau (5 %)-Essigsäure (5 %)-Färbung (nach Vierheilig et al., 1998)

Die entfärbten Wurzeln wurden für 30 min in der Färbelösung bei 90 °C inkubiert, in Leitungswasser gewaschen und mikroskopiert.

DAB-Färbung

3, 3'-Diaminobenzidin wurde in *A. dest.* unter Zugabe von HCl bis zur Reduktion des pH-Wertes auf 3,8 gelöst. Die verwendete Konzentration betrug 23 mM. Die Wurzeln ganzer Pflanzen, die mit und ohne *P. indica* kultiviert wurden, wurden mit der DAB-Lösung überschichtet. Die Wurzeln färbten sich nach wenigen Minuten braun. DAB dient zum Nachweis von H₂O₂.

NBT-Färbung

Eine 6 mM NBT-Lösung (Nitroblautetrazolium) wurde zum Färben der Wurzeln von Keimlingen verwendet. Die Färbung erfolgte für 5-10 min. Die Reaktion wurde durch die Überführung in Leitungswasser beendet. Im Lichtmikroskop konnte durch die blau-violett-Färbung der Wurzelzellen O_2^- (Superoxidation) nachgewiesen werden.

2. 2. 15 Untersuchungen zur Wurzel- bzw. Wurzelhaarmorphologie von *Arabidopsis* und den Mutanten *rop1*, *rop6*, *rop1rop6*, *OX-rop1* und *OX-rop6*

Das Saatgut wurde auf MS-Medium mit 0,5 % (w/v) Phytigel ausplattiert, 2 Tage bei 4 °C im Dunkeln vernalisiert und anschließend vertikal im Dauerweißlicht weiterkultiviert. Nach 4 Tagen wurden die Wurzeln mit dem Leitz BIOMED-Mikroskop untersucht.

2. 2. 16 GeneChip® Expressionsanalyse

Aus den Interaktionsexperimenten (s. 2. 2. 4) vom *Arabidopsis*-Wildtyp und der Doppelmutante *rop1rop6* stammendes Wurzelmaterial wurde nach 2 und 6 Tagen geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Die RNA-Isolation wurde wie in 2. 2. 5. 4 beschrieben, durchgeführt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde auf Trockeneis an das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB, Regensburg) versandt, welches die Durchführung der *microarrays* übernahm. Es wurde der *GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array* der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) verwendet.

Bei diesen DNA-Chips werden mittels photolithographischer Festphasensynthese Oligonukleotide direkt auf einem Glasträger synthetisiert. Zunächst werden photolabile Schutzgruppen auf den Glasträger aufgebracht, die die Startpunkte für die Oligonukleotidsynthese darstellen. Anschließend werden mit Hilfe photolithographischer Masken die Schutzgruppen an den Stellen entfernt, an denen eine Base, z. B. Adenin binden soll. Diese angekoppelten Nukleotide besitzen ebenfalls ein Schutzgruppe und der Vorgang der gerichteten Bestrahlung mit anschließender Ankopplung neuer Nukleotide an bestimmte Stellen erfolgt bis eine Oligonukleotidsequenz von 25 Basen erreicht wird. Dieses Verfahren ermöglicht eine extrem hohe cDNA-Probindichte (ca. 300 000 cDNAs auf 1,28 cm², Lipshutz *et al.*, 1999). Aufgrund der kurzen Oligonukleotidsequenzen kann es jedoch zu Fehlhybridisierungen kommen. Um diesen Nachteil auszugleichen, werden für jedes Gen 11 Paare (*probe sets*) von 25-mer Oligonukleotiden eingesetzt, die zu verschiedenen Regionen der Zielsequenz komplementär sind. Jedes Oligonukleotid-Paar besteht aus einer perfekt passenden Sequenz (*perfect match*) und einer Sequenz, die eine Fehlbase enthält (*missmatch*). Die Differenz der Hybridisierungsergebnisse von *perfect match* und *missmatch* wird verwendet, um das endgültige Ergebnis zu erhalten (Lipshutz *et al.*, 1999). Zur Detektion der biotinylierten cRNA-Moleküle wird das Streptavidin-Biotin-System verwendet, welches die

Bindungsaffinität von Streptavidin zu Biotin ausnutzt. Nach der Hybridisierung wird ein Konjugat aus Streptavidin und dem fluoreszierenden Farbstoff Phycoerythrin zugegeben und der Chip kann nach einem Waschvorgang gesichtet werden. Die vom Scanner erhaltenen Signale werden mit der *GeneChip Operating Software* (GCOS 1.4) von Affymetrix ausgewertet. Im Anschluss an das Scannen werden zunächst die Hybridisierungssignale der Oligonukleotide berechnet. Der Berechnung der Signalintensität für jedes *probe set* geht eine Hintergrund-Korrektur voraus. Zu dieser gehört z. B. die Verrechnung der *missmatch*-Oligonukleotide. Die Signalintensität der *probe sets* ist ein Maß für die Häufigkeit des Transkripts. Die Berechnung des *detection p-value* hingegen gibt Auskunft über die Wahrscheinlichkeit bzw. das Maß der Signifikanz der Messung. Der *detection call* definiert ein bestimmtes Transkript als *present* (P), *marginal* (M) oder *absent* (A). Um zwei Versuche miteinander vergleichen zu können, müssen diese einer Normalisierung unterzogen werden. Dafür werden alle Werte mit dem zuvor berechneten *scale faktor* (SF) multipliziert. Die Expressionsunterschiede der *probe sets* zwischen Kontroll-Chip und Versuchs-Chip werden in Form eines zur Basis 2 logarithmierten Signal-Verhältnisses (*signal log ratio*) dargestellt. Ist dieses Verhältnis gleich 1, entspricht das einem *fold change* von 2 bzw. einer Verdopplung der Transkriptmenge. Parallel dazu wird der *change p-value* berechnet, der Auskunft über das Maß der Signifikanz der Expressionsunterschiede eines Transkripts zwischen Kontrolle und Experiment gibt. Liegt dieser Wert innerhalb bestimmter Grenzen, wird im *change call* der Expressionsunterschied als *increase* (I), *marginal increase* (MI), *no change* (NC), *marginal decrease* (MD) oder *decrease* (D) wiedergegeben. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt als Excel-Tabelle. Der Gesamt-Genom Chip für *Arabidopsis* gibt Auskunft über die Expression von über 24000 Gensequenzen. Die einzelnen Schritte zur Bearbeitung der Gesamt-RNA bis zur Hybridisierung sind in Abb. 2. 1 dargestellt.

Das für die *microarrays* verwendete Pflanzenmaterial stammte aus Interaktionsexperimenten von *Arabidopsis* und *P. indica*, das am 2. und 6. Tag der Kokultivierung geerntet wurde. Die Kultivierung wurde auf PNM-Medium durchgeführt. Es wurde je eine Chip-Analyse für den *Arabidopsis*-Wildtyp ohne *P. indica* (Kontrolle) und eine Chip-Analyse für den Wildtyp kultiviert mit *P. indica* (Behandlung) durchgeführt. Die Signale der beiden Chips wurden anschließend mit Hilfe der GCOS 1.4-Software ausgewertet und eine Vergleichsanalyse zwischen Kontrolle und Behandlung durchgeführt. Für die Doppelmutante *rop1rop6* wurde ebenso verfahren.

Da für jeden Zeitpunkt (2. und 6 Tag.) nur eine Vergleichsanalyse vorliegt, ist eine statistische Auswertung der regulierten Gene nicht möglich.

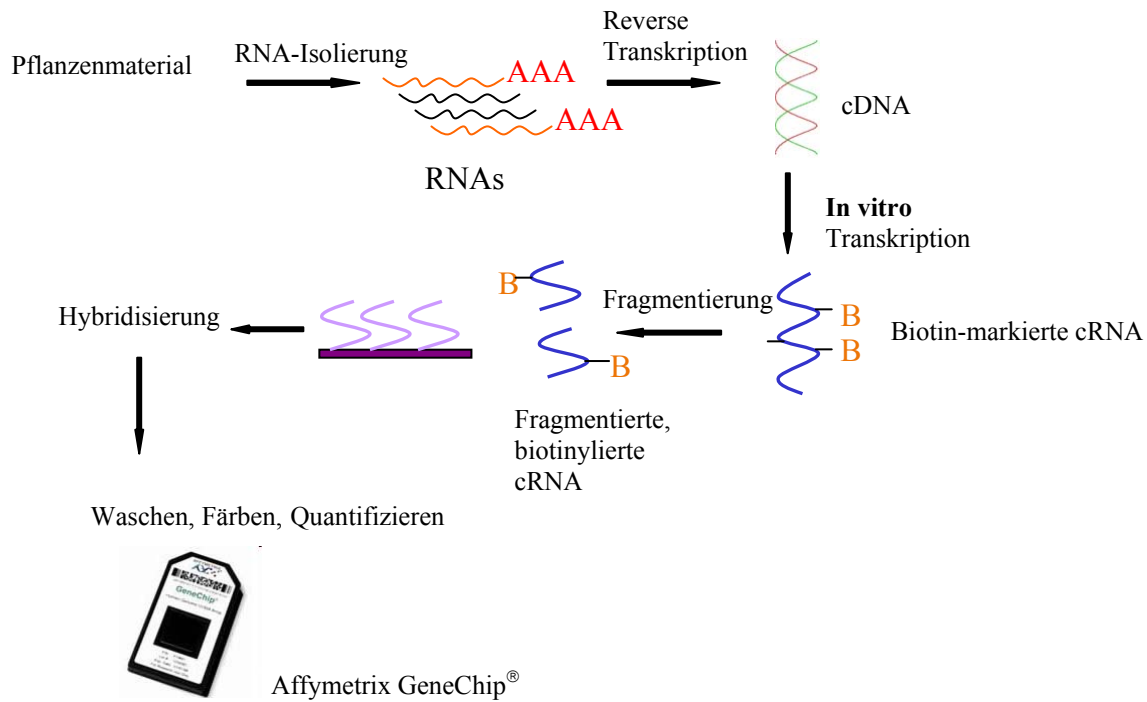


Abb. 2. 1: Probenaufarbeitung und Hybridisierung für die GeneChip® Expressionsanalyse

2. 2. 17 Phylogenetische Analyse der kleinen G-Proteine

Für die phylogenetische Analyse der 93 Gene, welche in *Arabidopsis* für kleine G-Proteine kodieren (Vernoud *et al.*, 2003), wurden zunächst die Proteinsequenzen dieser Gene zusammengestellt. Dafür wurde die Datenbank von *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*, Rockville Pike, MD, USA) verwendet. Für den Vergleich der Sequenzen wurde das Programm *MultAlin* (Corpet, 1988) von *ExPASy* (Swiss Institute of Bioinformatics) benutzt. Nach dem Sequenzvergleich erfolgte die manuelle Entfernung sogenannter *gaps* (Lücken, die durch den Sequenzvergleich entstanden sind), dies führte zu einer stärkeren Bewertung der konservierten Sequenzbereiche. Mit dem Programm *TreeTop* (Yushmanov und Chumakov, 1988; Brodsky *et al.*, 1995) von *GenBee* (A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Russland) wurde ein phylogenetischer Baum mit 1000 Bootstrap-Wiederholungen berechnet und mit *Phylip* (Felsenstein, 1989) als *unrooted neighbor-joining tree* dargestellt.

3 Ergebnisse

3. 1 Identifizierung von *rop1*-, *rop6*- und *ric4*-Mutanten

Die Bedeutung der kleinen G-Proteine ROP1 und ROP6, sowie RIC4, einem bekannten Interaktionspartner von ROP1 (Wu *et al.*, 2001), für die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* wurde mit Hilfe von *knock-out*-Mutanten untersucht. Die verwendeten T-DNA-Insertionslinien wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen (Alonso *et al.*, 2003). Es wurden die Linien SALK_015799, SALK_075913 und SALK_091737 verwendet.

Tab 3. 1: T-DNA Insertionslinien

SALK-Linie	Genlokus	Bezeichnung d. Proteins	Bezeichnung d. Mutante
SALK_015799	<i>At5g16490</i>	RIC4	<i>ric4</i>
SALK_075913	<i>At3g51300</i>	ROP1	<i>rop1</i>
SALK_091737	<i>At4g35020</i>	ROP6	<i>rop6</i>

3. 1. 1 Genotypische Analyse der T-DNA-Insertionen

Zur Selektion der Pflanzen nach Wildtyp, heterozygoten bzw. homozygoten Mutanten, wurde zunächst eine PCR auf DNA-Ebene mit den genspezifischen Primern RP und LP durchgeführt. Wird mit den genspezifischen Primern ein Produkt amplifiziert, handelt es sich um eine Wildtyp oder eine heterozygote Pflanze. Aufgrund der Größe der T-DNA (5000 Bp) ist eine Produktamplifikation des Gens bei homozygoten Mutanten nicht möglich. Anschließend erfolgte eine PCR mit einem genspezifischen Primer und dem T-DNA spezifischen Primer LBa1. Bei dieser PCR-Reaktion kommt es nur bei homo- bzw. heterozygoten Mutanten zu einer Produktamplifikation, da die T-DNA spezifischen Primer LBa1 bzw. LBb1 direkt an der T-DNA binden (Abb. 3. 1). Um die exakte Insertionstelle der T-DNA im Gen zu finden bzw. die Angaben vom NASC-Institut zu überprüfen, wurden die Produkte aus der zweiten PCR-Reaktion in den pGEM-Vektor kloniert und sequenziert (s. 2. 2. 6, 2. 2. 7).

Die Angabe der Basen, zwischen denen die T-DNA inseriert ist, bezieht sich auf das Startcodon des entsprechenden Gens. Nur der T-DNA-Insertionsort der Mutante *rop1* stimmt mit den Informationen des NASC-Institutes überein (Abb. 3. 3). Der Insertionsort der T-DNA in der Mutante *ric4* liegt zwischen der 268. und 269. Base anstelle der 257. und 258. Base im 2. Exon (Abb. 3. 2). Auch die Information des NASC-Institutes für die Mutante *rop6*, in welcher sich die T-DNA im 2. Exon zwischen der 415. und 416. Base befinden soll, konnte nicht bestätigt werden. Die T-DNA ist in dieser Mutante am Ende des 2. Introns zwischen der 564. und 565. Base inseriert (Abb. 3. 4).

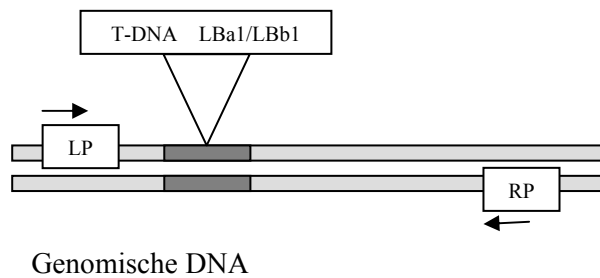


Abb. 3. 1: Strategie zur Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutanten. LP: linker genspezifischer Primer, RP: rechter genspezifischer Primer, LBA1 bzw. LBB1: T-DNA spezifischer Primer.

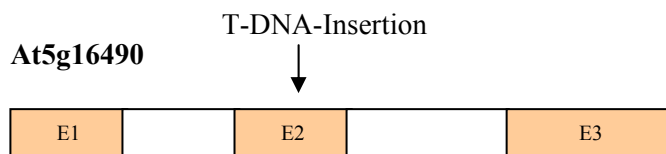


Abb. 3. 2: T-DNA-Insertion in der Mutante *ric4*. Die T-DNA ist in der Mutante *ric4* zwischen der 268. und 269. Base im 2. Exon inseriert.

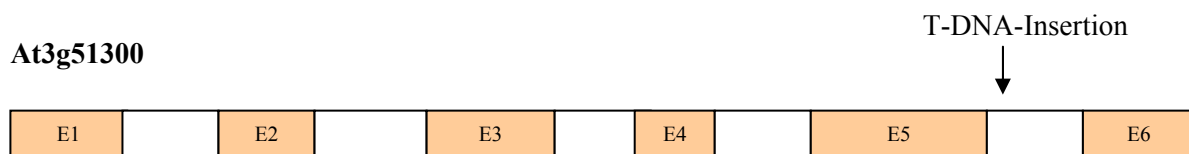


Abb. 3. 3: T-DNA-Insertion in der Mutante *rop1*. Die T-DNA ist in der Mutante *rop1* zwischen der 846. und 845. Base im 5. Intron inseriert.

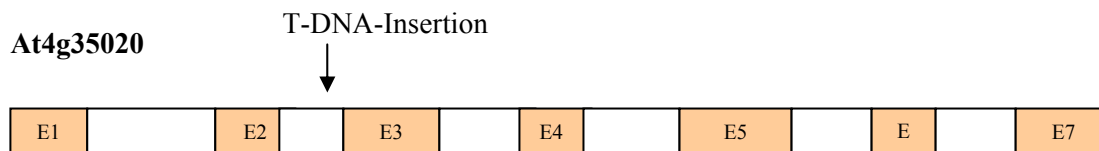


Abb. 3. 4: T-DNA-Insertion in der Mutante *rop6*. In der Mutante *rop6* ist die T-DNA zwischen der 564. und 565. Base am Ende des zweiten Introns inseriert.

Die Doppelmutante *rop1rop6* wurde durch Kreuzung der T-DNA-Mutanten (Abb. 3. 3 und Abb. 3. 4) hergestellt. Die Linie *rop6* diente als Pollenspender, da ein Fehlen von ROP1 Einfluss auf das Pollenschlauchwachstum hat (Li *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2005). Das Saatgut homozygoter Pflanzen aus der F₂-Generation wurde für die Experimente verwendet.

3. 1. 2 Analyse der genspezifischen mRNAs in den Mutanten *rop1*, *rop6*, *rop1rop6* und *ric4/3*

Die Insertion der T-DNA in ein Gen, insbesondere in ein Exon, sollte die Synthese der mRNA ausschließen und somit zu einem Verlust der Genfunktion führen (Krysan *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2003). Um dies zu überprüfen, wurde die mRNA-Menge des mutierten Gens mit genspezifischen Primern in einer RT-PCR untersucht. Da die Besiedelung von *Arabidopsis* durch *P. indica* über die Wurzel erfolgt, wurde Gesamt-RNA aus Wurzeln isoliert und für die cDNA-Synthese verwendet. Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurden die konstitutiv exprimierte mRNAs für *actin2* (*At3g18780*) und *gapC* (*At3g04120*) amplifiziert. Um Kontaminationen des PCR-Reaktionsansatzes festzustellen, wurde jeweils ein PCR-Ansatz mit H₂O (Bezeichnung K in Abb. 3. 5 bis 3. 11) anstelle von DNA bzw. cDNA durchgeführt. Die Doppelmutante *rop1rop6* wird in den Abbildungen mit *d.ko* abgekürzt. Wie in Abb. 3. 5 zu sehen ist, wird *rop1* nicht ausschließlich in Infloreszenzen exprimiert (Li *et al.*, 1998; Vernoud *et al.*, 2003), sondern auch in Wurzeln. Die Insertion der T-DNA in ein Intron von *rop1* bzw. *rop6* (Abb. 3. 3 und 3. 4) verhinderte die Expression des Gens. Es handelte sich demzufolge um eine *knock-out*-Mutante. Die fehlende Expression von *rop1* oder *rop6* in den *knock-out*-Linien führte nicht zu einer verstärkten Expression des jeweils anderen *rop*-Gens. Die etwas stärkere Bande von *rop6* in der *rop1*-Linie bedeutet keine verstärkte Genexpression, da auch die Bande für das *housekeeping*-Gen *actin2* stärker ist, was z. B. durch eine effizientere cDNA-Synthese verursacht sein kann.

In der Mutante *ric4/3* der Linie SALK_015799, deren T-DNA-Insertion sich im 2. Exon befindet (Abb. 3. 2), konnte in den Wurzeln von *Arabidopsis* kein Transkript für *ric4*, nachgewiesen werden. Somit handelte es sich um eine homozygote *knock-out*-Mutante (Abb. 3. 6). In den heterozygoten Mutanten *ric4/2* und *ric4/4* war eine verringerte *ric4*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Die mRNA von *ric4* wird in allen Gewebetypen von *Arabidopsis* exprimiert (Wu *et al.*, 2001). Als Kontrolle wurde cDNA und DNA vom Wildtyp mit den für *ric4*-spezifischen Primern untersucht (Abb. 3. 6) und das *housekeeping*-Gen *gapC* mit der Primerkombination GapC-LP und GapC-RT-RP amplifiziert (Abb. 3. 7).

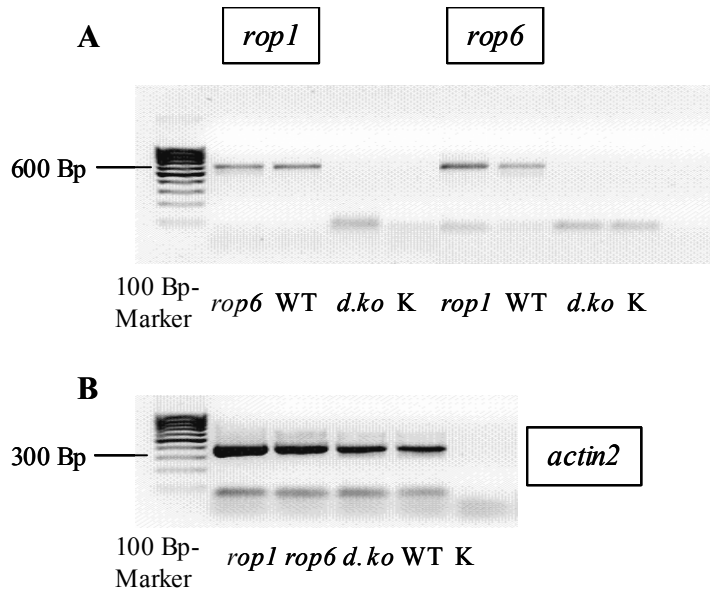


Abb. 3. 5: Expression der Gene *rop1*, *rop6* (A) und *actin2* (B) im Wildtyp und in den Mutanten. Die Expression der Gene *rop1* (RT-PCR mit 33 Zyklen), *rop6* (RT-PCR mit 28 Zyklen) und *actin2* (RT-PCR mit 25 Zyklen) wurde in WT- und Mutanten-Wurzeln untersucht (*rop1*-, *rop6*-Mutante, Doppelmutante *d.ko*, K: H₂O).

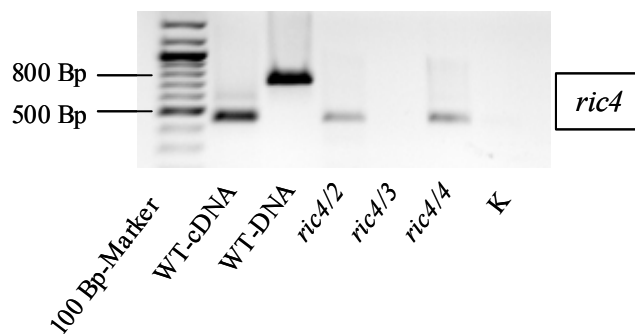


Abb. 3. 6: Expression von *ric4* im Wildtyp und in den *ric4*-Mutanten. Die Expression von *ric4* wurde in den Wurzeln des Wildtyps und in den Individuen *ric4/2* (heterozygote Mutante), *ric4/3* (homozygote Mutante) und *ric4/4* (heterozygote Mutante) untersucht (RT-PCR und PCR mit 35 Zyklen, K: H₂O).

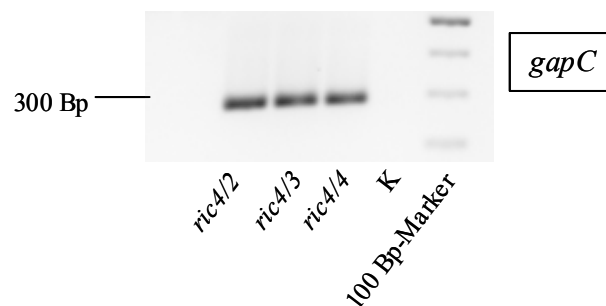


Abb. 3. 7: Expression von *gapC* in den *ric4*-Mutanten. Die Expression von *gapC* wurde in den Wurzeln der Individuen *ric4/2* (heterozygote Mutante), *ric4/3* (homozygote Mutante) und *ric4/4* (heterozygote Mutante) untersucht (RT-PCR mit 28 Zyklen, Primerkombination GapC-RT-RP und GapC-LP, K: H₂O).

3. 1. 3 Quantifizierung der T-DNA durch quantitative PCR

Die durchschnittliche Anzahl von T-DNA-Insertionen in einer transformierten Pflanze liegt laut Statistik bei 1,5 Insertionsereignissen, sie werden stabil vererbt und per Zufall in das Genom integriert (Alonso *et al.*, 2003). Da die Doppelmutante *rop1rop6* für die Herstellung weiterer Mutanten (s. 2. 2. 8. 1 und 2. 2. 8. 2) verwendet wurde, und zusätzliche T-DNA-Insertionen in kodierende Bereiche anderer Gene die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* beeinflussen könnten, wurde eine Quantifizierung der T-DNA in den Ausgangsmutanten von *rop1* und *rop6* für die F₁- und F₂-Generationen durchgeführt. Zum Vergleich der Bandenstärke wurde eine als heterozygot getestete Mutante aus der F₁-Generation der Linie *rop1* verwendet. Bei allen weiteren Mutanten handelte es sich um homozygote *knock-out*-Mutanten. Die Doppelmutante *rop1rop6* ging aus den homozygoten F₂-Generationen der Mutanten *rop1* und *rop6* hervor.

Für jede PCR-Reaktion wurden 0,5 µg DNA eingesetzt. Wie in Abb. 3. 8 zu sehen ist, besitzt der Wildtyp keine T-DNA-Insertion. In den homozygoten F₁- und F₂-Generationen von *rop1* bzw. *rop6* war die T-DNA-Sequenz gleichwertig nachweisbar. Die Stärke der Bande für *rop1rop6* wies auf eine höhere T-DNA Ausgangskonzentration hin. Die Bandenstärke einer heterozygoten *rop1*-Mutante hingegen ist leicht verringert. Abb. 3. 8 führt zu der Annahme, dass die homozygote *rop1* Mutante der F₂-Generation und die homozygoten *rop6* Mutanten der F₁- und F₂-Generationen die gleiche Anzahl von T-DNA-Insertionen (eine Insertion) besitzen.

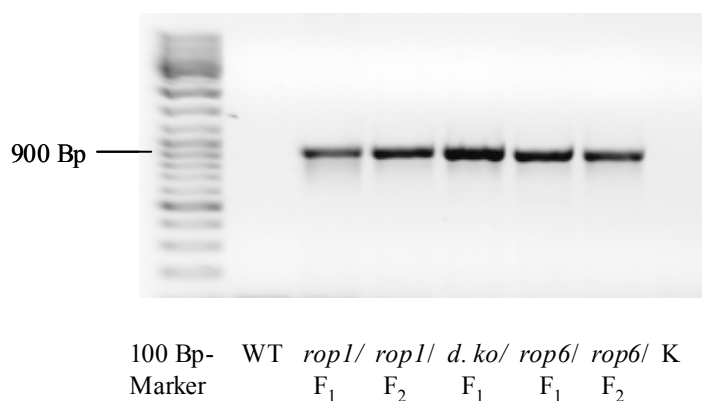


Abb. 3. 8: Quantifizierung der T-DNA im Wildtyp und in den Mutanten. Für jede PCR-Reaktion wurden 0,5 µg DNA eingesetzt. Reihenfolge der Proben: WT, *rop1*/F₁ (heterozygote Mutante), *rop1*/F₂ (homozygote Mutante), *d.ko*/F₁ (homozygote Doppelmutante), *rop6*/F₁ (homozygote Mutante), *rop6*/F₂ (homozygote Mutante), K: H₂O, PCR mit 32 Zyklen.

3. 2 Die Überexpressionsmutanten OX-*rop1* und OX-*rop6*

Um die physiologischen Funktionen von ROP1 bzw. ROP6 und ihre Bedeutung für die Interaktion mit *P. indica* zu charakterisieren, wurden neben den *knock-out*-Linien dieser Gene auch Überexpressionslinien hergestellt. So verursacht das Fehlen oder die Hemmung von ROP1 in Pollenschläuchen u. a. eine Abnahme des F-Aktins an der Spitze des Pollenschlauches und eine Wachstumshemmung, die Überexpression hingegen führt zu einer Stabilisierung des F-Aktins und depolarisiertem Wachstum (Kost *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999;

Fu *et al.*, 2001). Nach Selektion der transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen (s. 2. 2. 11. 2) wurde die Gesamt-RNA isoliert und für die cDNA-Synthese eingesetzt. In den folgenden Abbildungen dient die Bezeichnung OX1 bzw. OX6 als Abkürzung für Einzelindividuen der Linien OX-*rop1* und OX-*rop6*. Die mRNA von *rop1* ist in den Pflanzen OX1/2 und OX1/4 stärker exprimiert, als in OX1/1, OX1/3 und den als Kontrollen verwendeten Pflanzen OX6/1, OX6/3, OX6/4 bzw. WT (Abb. 3. 9).

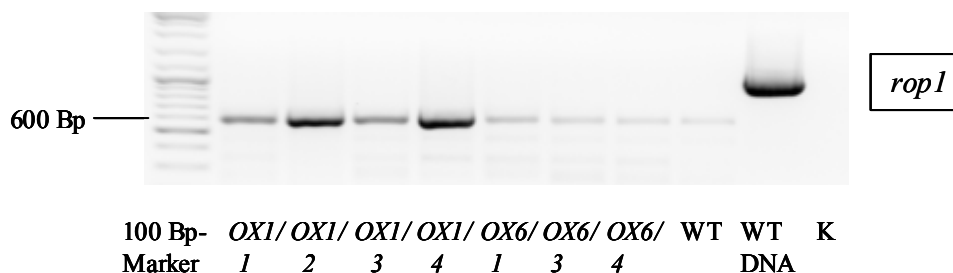


Abb. 3. 9: Expression von *rop1* in den Überexpressionsmutanten und im Wildtyp. Die Expression von *rop1* wurde in den Wurzeln der *rop1*-Überexpressionsmutanten (OX1/1-4), in den *rop6*-Überexpressionsmutanten (OX6/1, 3, 4) und im WT untersucht (RT-PCR mit 35 Zyklen, K: H₂O).

In Abb. 3. 10 ist die Expression der mRNA von *rop6* in den Überexpressionsmutanten und den Kontrollen OX1/2, OX1/4 und WT zu sehen. In den Mutanten OX6/1 und OX6/4 wird *rop6* verstärkt exprimiert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche cDNA-Synthese wurde das *housekeeping*-Gen *gapC* mit der Primerkombination GapC-LP und GapC-RP amplifiziert (Abb. 3. 11).

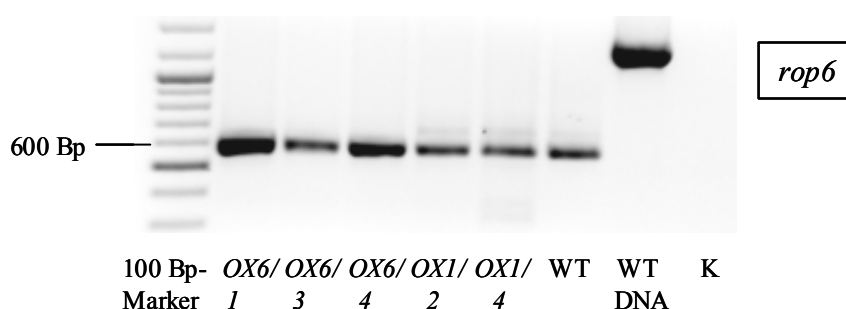


Abb. 3. 10: Expression von *rop6* in den Überexpressionsmutanten und im Wildtyp. Die Expression von *rop6* wurde in den Wurzeln der *rop6*-Überexpressionsmutanten (OX6/1, 3, 4), in den *rop1*-Überexpressionsmutanten (OX1/2, 4) und im WT untersucht (RT-PCR mit 31 Zyklen, K: H₂O).

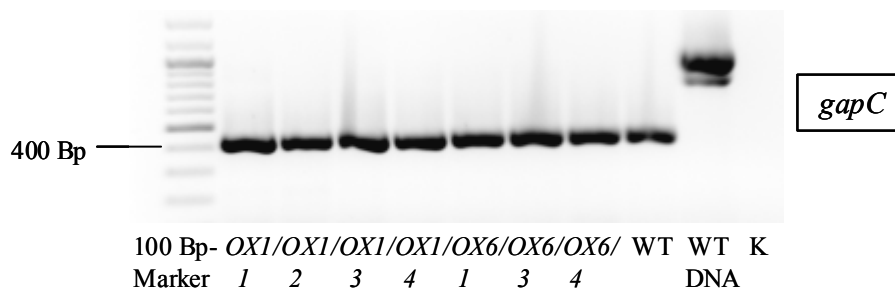


Abb. 3.11: Expression von *gapC* in den Überexpressionsmutanten und im Wildtyp. Die Expression von *gapC* wurde in den Wurzeln der *ropI*-Überexpressionsmutanten (OX1/1-4), in den *rop6*-Überexpressionsmutanten (OX6/1, 3, 4) und im WT untersucht (RT-PCR mit 30 Zyklen, K: H₂O).

3.3 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

Eine Veränderung des Genotyps durch Mutation kann zu Veränderungen im Entwicklungsprogramm (Ontogenese) einer Pflanze und zur Beeinflussung des Phänotyps führen.

3.3.1 Analyse der Keimung

Bei der Durchführung der Interaktionsexperimente zwischen dem *Arabidopsis*-Wildtyp und den Mutanten mit *P. indica* fiel auf, dass die Pflanzen der Linie *rop1rop6* nach 9 Tagen Kultivierung auf MS-Medium und somit zu Beginn der Interaktionsexperimente (s. **2.2.4**) größer waren als der Wildtyp. Es wurde vermutet, dass die Samen der Linie *rop1rop6* früher keimen als der Wildtyp, da es Hinweise auf eine Beteiligung von ROP-GTPasen an der Samenkeimung gibt (Li *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2002) und ROPs funktionell redundant sein können, wie am Beispiel von ROP1, ROP3 und ROP5 während des Pollenschlauchwachstums beobachtet wurde (Kost *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Vernoud *et al.*, 2003).

In Abb. 3. 12 ist die Anzahl der gekeimten Samen, bezogen auf die Anzahl der insgesamt gekeimten Samen (s. **2. 2. 12**) dargestellt. Keimung ist definiert als der Durchbruch der embryonalen Wurzel durch Endosperm und Testa (Bewley, 1997). Der mikroskopisch sichtbare Austritt der Keimlingswurzel aus der Samenschale wurde demzufolge als Keimung gewertet.

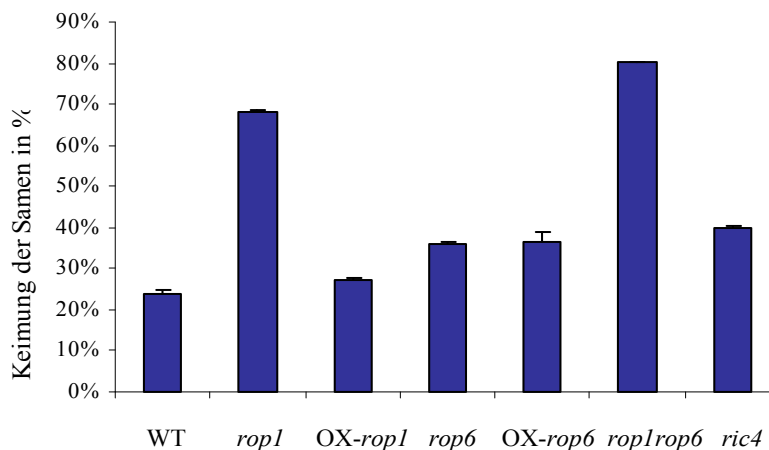


Abb. 3. 12: Anzahl der gekeimten Samen des Wildtyps und der Mutanten. Die Keimung der Samen des Wildtyps und der *rop1*-, *OX-rop1*-, *rop6*-, *OX-rop6*-, *rop1rop6*- und *ric4*-Mutanten wurde nach 48 h Vernalisation bei 4 °C und anschließender Kultivierung im Dauerweißlicht ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei 22 °C) für 24 h untersucht (3 unabhängige Wiederholungen mit ca. 50 Samen pro Experiment, Darstellung mit STABW).

Nach 24 h sind 23,8 % der Samen des Wildtyps gekeimt. Die Mutante *rop1* zeigt eine Keimungsrate von 67,9 %, das Fehlen von ROP1 führt demzufolge zu einer früheren Keimung der Samen. Die Überexpression von *rop1* hat weder einen hemmenden noch fördernden Einfluss auf die Keimung. Das Fehlen bzw. die Überexpression von *rop6* bewirkt eine um ca. 10 % erhöhte Keimungsrate verglichen mit dem Wildtyp. Die Doppelmutante *rop1rop6* weist eine Keimungsrate von 80 % nach 24 h auf. Fehlen die GTPasen ROP1 und ROP6, so wirkt sich dies besonders stark auf eine frühere Keimung aus, wobei die *knock-out*-Mutation von *rop1* einen weitaus größeren Einfluss hat. Das Fehlen von RIC4 wirkt sich ebenfalls fördernd auf die Keimung aus. Die Keimungsrate nach 24 h beträgt 40 %.

3. 3. 2 Wurzel- bzw. Wurzelhaarmorphologie im Wildtyp und in den Mutanten *rop1*, *rop6*, *rop1rop6*, *OX-rop1* und *OX-rop6*

Untersuchungen an Mutanten für die GTPasen ROP2, ROP4 und ROP6 sprechen für eine Beteiligung dieser Proteine an der Regulation des Wurzelhaarwachstum (Jones *et al.*, 2002; Molendijk *et al.*, 2001). Da *P. indica Arabidopsis* über die Wurzel bzw. Wurzelhaare besiedelt, war es von großem Interesse, die Morphologie der Wurzel und Wurzelhaare der Mutanten zu charakterisieren. Die 4 Tage alten Keimlinge (s. 2. 2. 15) wurden mikroskopisch auf Anzahl der Seitenwurzeln bzw. Seitenwurzelanlagen, Wurzeldicke bzw. -länge und die Beschaffenheit der Wurzelhaare untersucht. Die untersuchten *rop1*- und *rop6-knock-out*- und Überexpressions-Mutanten einschließlich der Doppelmutante und *ric4*-Mutante zeigten keine Veränderungen bezüglich der Anzahl der Seitenwurzeln. In der Dicke der Wurzel

unterschieden sich Mutanten und Wildtyp nicht voneinander (120 μm bis 200 μm). Die Länge der Primärwurzel der 4 Tage alten Keimlinge wies deutliche Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtyp auf (Abb. 3. 13).

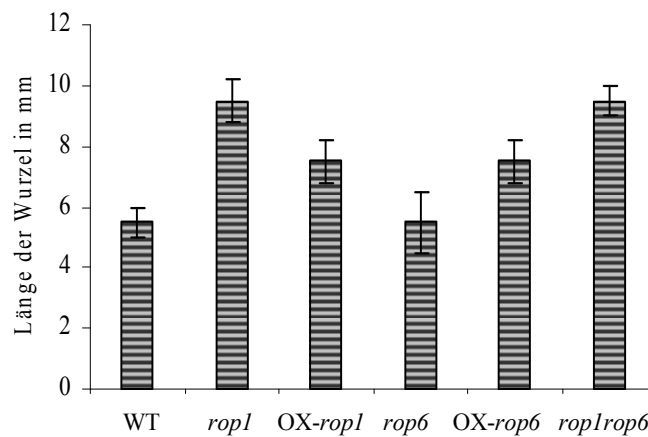


Abb. 3. 13: Länge der Primärwurzeln des Wildtyps und der Mutanten am 4. Tag nach der Keimung. Die Länge von mindestens 20 Primärwurzeln des Wildtyps und der Mutanten *rop1*, *OX-rop1*, *rop6*, *OX-rop6* und *rop1rop6* wurde untersucht (Darstellung mit STABW).

Die Länge der Wurzel des Wildtyps betrug 5 bis 6 mm, *rop1* und *rop1rop6* haben eine Wurzellänge von 9,5 mm und auch die Überexpressionsmutanten *OX-rop1* und *OX-rop6* haben mit 7,5 mm eine längere Wurzel als der Wildtyp. Die *rop6-knock-out*-Mutation wirkt sich nicht auf die Wurzellänge aus, so dass die Wurzellänge von *rop1rop6* auf die fehlende Expression von ROP1 zurückzuführen ist.

Für die in Abb. 3. 14 A und B bzw. in Abb. 3. 15 und Abb. 3. 16 dargestellten Ergebnisse wurde ein 1 mm langer Primärwurzelabschnitt (2,5 mm entfernt von der Wurzelspitze) mikroskopiert. Die Wurzelhaare wurden unabhängig von ihrer Länge in die Messung einbezogen. Verzweigte Wurzelhaare wurden als ein Wurzelhaar gewertet, da nur eine Wurzelhaarbasis erkennbar war. Die Zahl der Wurzelhaare im Wildtyp liegt bei durchschnittlich 33,6 Wurzelhaaren/mm (Abb. 3. 14 A). Jede Wurzelhaarzelle bildet nur ein Wurzelhaar aus (Masucci und Schiefelbein, 1994). Keine der untersuchten Mutanten weist deutliche Abweichungen zu diesem Wert auf, ROP1 und ROP6 haben demnach keinen direkten Einfluss auf die Anzahl der Wurzelhaare je Wurzelhaarzelle. Die Insertion eines Wurzelhaares einer Wurzelhaar-ausbildenden Zelle befindet sich am Ende der Zelle in Richtung der Wurzelspitze (Masucci und Schiefelbein, 1994). Der Insertionsort der Wurzelhaare wies in keiner Mutante Abweichungen gegenüber dem Wildtyp auf.

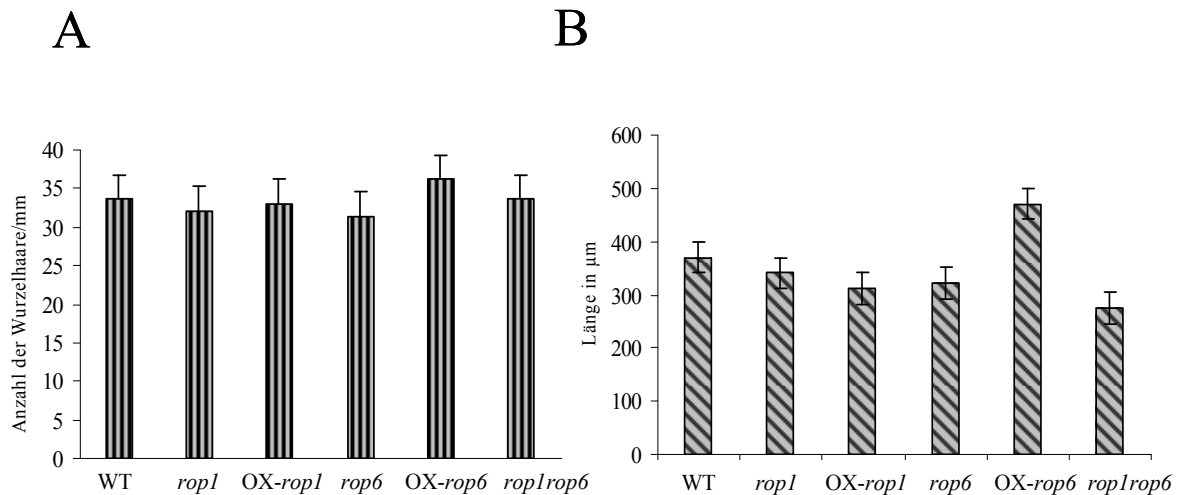


Abb. 3. 14: Anzahl der Wurzelhaare (A) und Länge der Wurzelhaare (B) des Wildtyps und der Mutanten. Im Wildtyp und in den Mutanten *rop1*, *OX-rop1*, *rop6*, *OX-rop6* und *rop1rop6* wurde ein Wurzelabschnitt von 1 mm, der 2,5 mm von der Wurzelspitze entfernt lag, untersucht (mindestens 4 unabhängige Experimente mit je 10 Wurzeln, Darstellung mit STABW).

In Abb. 3. 14 B ist die durchschnittliche Länge der Wurzelhaare des Wildtyps und der Mutanten dargestellt. Der Mittelwert der Wurzelhaarlänge des Wildtyps liegt bei 370 µm. Das Fehlen von ROP1 führt zu einer geringen Abnahme der Länge der Wurzelhaare, wobei die Standardabweichung vom Mittelwert die Schwankungen der Messwerte widerspiegelt. Die Abnahme der Wurzelhaarlänge in *OX-rop1* und *rop6* gegenüber der Länge des Wildtyps beträgt im Mittel 50 µm. Im Gegensatz dazu sind die Wurzelhaare der Linie *OX-rop6* durchschnittlich 100 µm länger als die des Wildtyps. Die Doppelmutante *rop1rop6* besitzt mit ca. 270 µm im Mittel deutlich kürzere Wurzelhaare als die anderen Mutanten und der Wildtyp. Eine Veränderung der Dicke der Wurzelhaare konnte bei den Mutanten nicht beobachtet werden (Abb. 3. 16). Der Durchmesser der ausgewachsenen Wurzelhaare lag zwischen 10 und 15 µm.

Im Wildtyp von *Arabidopsis* sind verzweigte Wurzelhaare selten, einige Mutanten zeigen jedoch eine größere Zahl verzweigter Wurzelhaare, wie z. B. *tip1* (Ryan *et al.*, 1998) oder *cen2* (Parker *et al.*, 2000). Die Mutanten *tip1* und *cen2* besitzen kürzere und dickere Wurzelhaare als der Wildtyp, die außerdem oft verzweigt sind (Grierson *et al.*, 2001). In Abb. 3. 15 ist die Anzahl der verzweigten Wurzelhaare im Wildtyp und den Mutanten dargestellt. Es wurde keine Unterscheidung getroffen, ob die Verzweigung an der Basis oder an der Spitze des Wurzelhaares auftritt, da beide Ereignisse in gleichem Maße auftreten. Im Wildtyp ist von 100 Wurzelhaaren weniger als ein Wurzelhaar verzweigt, dies entspricht den Ergebnissen von Ryan *et al.*, (1998) und Jones *et al.*, (2002). Die Linien *rop1* und *rop1rop6* besitzen eine geringe Anzahl verzweigter Wurzelhaare. Die Überexpression von *rop6* und *rop1* bewirkt eine deutliche Zunahme verzweigter Wurzelhaare von 10 - 12 % gegenüber dem

Wildtyp. Das Fehlen von ROP6 wirkt sich nicht auf die Verzweigung der Wurzelhaare aus, so dass die Zunahme in *rop1rop6* auf die fehlende Expression von *rop1* zurückzuführen ist. In Abb. 3. 16 sind die verzweigten Wurzelhaare der Mutanten *OX-rop1* (A-C) und *OX-rop6* (D und E) und des Wildtyps (F) dargestellt.

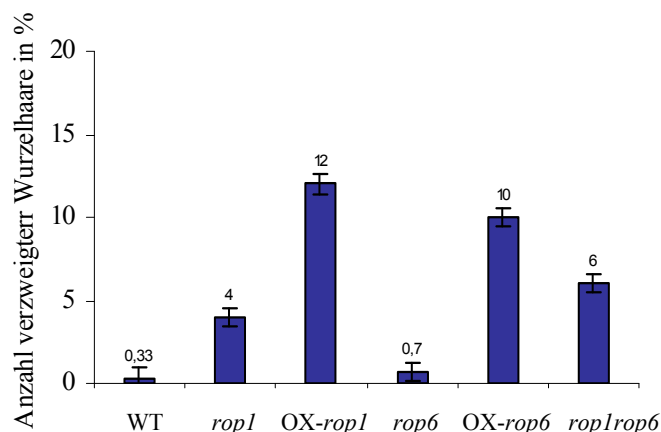


Abb. 3. 15: Anzahl der verzweigten Wurzelhaare im Wildtyp und in den Mutanten.

Im Wildtyp und in den Mutanten *rop1*, *OX-rop1*, *rop6*, *OX-rop6* und *rop1rop6* wurde ein Wurzelabschnitt von 1 mm, der 2,5 mm von der Wurzelspitze entfernt lag, untersucht (mindestens 5 unabhängige Experimente mit je 10 Wurzeln, Darstellung mit STABW).

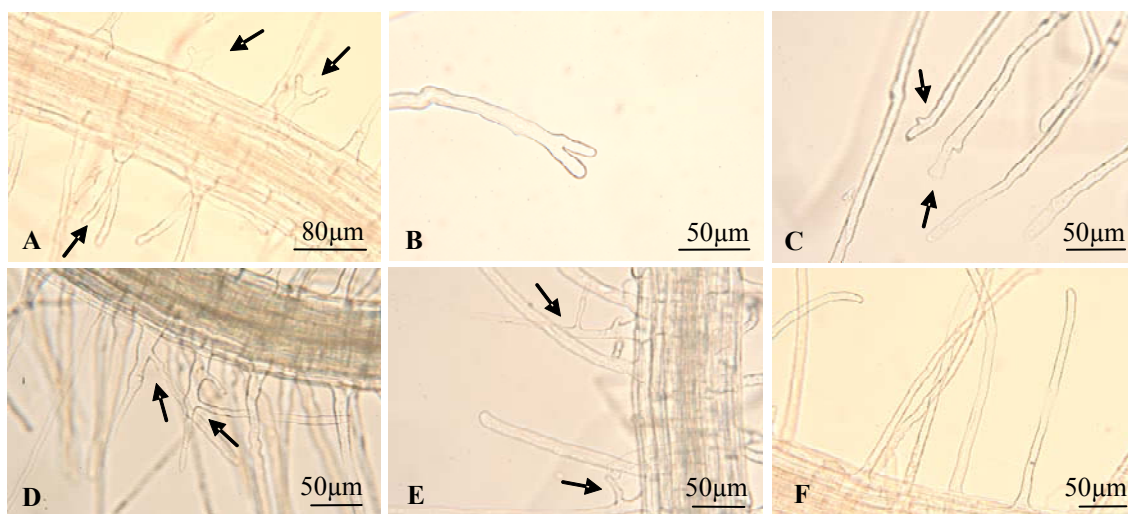


Abb. 3. 16: Verzweigte Wurzelhaare der Mutanten und des Wildtyps. A-C: *OX-rop1*, D und E: *OX-rop6* und Wildtyp (F); A: Verzweigung der Wurzelhaare an der Basis; B, C: ausgewachsene Wurzelhaare mit einer Verzweigung an der Spitze des Wurzelhaares; D, E: mehrfach verzweigte Wurzelhaare; F: unverzweigte Wurzelhaare des Wildtyps

Die Expression von ROP1 ist für die Polarität und das Wachstum des Pollenschlauches von großer Bedeutung (s. 1. 7) (Li *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2005). ROP1 wird, wie hier nachgewiesen werden konnte, auch in Wurzeln exprimiert (Abb. 3. 5 A). Die fehlende Expression von *rop1* in den Linien *rop1* und *rop1rop6* verursacht u. a. eine frühere Keimung, dies ist vermutlich auch Ursache für die Längenzunahme der Primärwurzel der Keimlinge von

rop1 bzw. *rop1rop6* gegenüber dem Wildtyp. Die Überexpression von *rop1* wirkt sich vor allem auf die Morphologie der Wurzelhaare aus und führt bei diesen zu einer häufigeren Verzweigung an der Basis oder der Spitze eines Wurzelhaares (Abb. 3. 15, Abb. 3. 16 A-C). Die Überexpression von *rop6* verursacht eine Längenzunahme der Wurzelhaare (Abb. 3.14 B) und einen erhöhten Anteil verzweigter Wurzelhaare (Abb. 3. 15, Abb. 3. 16 D und E).

3. 4 Interaktionsexperimente von *Arabidopsis* und den Mutanten *rop1*, *rop6*, *rop1rop6*, *OX-rop1*, *OX-rop6*, *ric4* mit *P. indica*

3. 4. 1 Ergebnisse der auf PNM-Medium durchgeführten Interaktionsexperimente

Die auf MS-Medium vorkultivierten Pflanzen wurden nach 9 Tagen auf PNM-Medium umgesetzt und mit bzw. ohne *P. indica* weiterkultiviert (s. 2. 2. 4). Nach 2, 4, 6, 10 und 14 Tagen wurde das Gewicht von Spross und Wurzel jeder Pflanze bestimmt. Graphisch dargestellt werden zunächst der 2., 6. und der 14. Tag der Frischmasse der Kontrollpflanzen, um den Einfluss der Mutation auf den Phänotyp der Pflanzen zu dokumentieren (Abb. 3. 17 A-C). In Abb. 3. 18 A und B wird der Einfluss von *P. indica* auf das Frischgewicht der Mutanten in Bezug auf das Frischgewicht des Wildtyps dargestellt. Es wird der 6. Kultivierungstag abgebildet, da an diesem Messpunkt der wachstumsfördernde Effekt von *P. indica* auf den Wildtyp eintritt (Abb. 3. 18 A). Weiterhin ist der 14. Tag für eine abschließende Bewertung der Interaktion dargestellt (Abb. 3. 18 B). Es wurden durchschnittlich 5 unabhängige Wachstumskinetiken mit 12 Kontrollpflanzen und 12 mit Pilz kultivierten Pflanzen für jeden Messpunkt ausgewertet.

Mit Ausnahme der Linien *ric4* und *rop6* besitzen die Mutanten nach 2 Tagen auf PNM-Medium eine größere Wurzelmasse als der Wildtyp. Die Linien *OX-rop1* und *rop1rop6* zeigen die größte Gewichtszunahme auf 150 % verglichen mit dem Frischgewicht von 100 % des Wildtyps. Die Linie *ric4* weist nur 50 % der Wurzelmasse des Wildtyps auf. Eine geringe Zunahme des Sprossgewichts zeigen die Linien *rop1*, *OX-rop1*, *rop6* mit ca. 10 % und eine deutlich größere Masse des Sprosses besitzen die Linien *OX-rop6* (auf 126 %) und *rop1rop6* (auf 155 %). Das Sprossgewicht der Linie *ric4* liegt bei 73 % des Wildtyps. Die angegebenen Prozentzahlen sind die Mittelwerte aus den Wachstumskinetiken. Anhand dieser Ergebnisse ist eine Verschiebung des Wurzel-/Sprossverhältnisses in der Linie *OX-rop1* zugunsten der Wurzel feststellbar, d. h. das Frischgewicht der Wurzel (+ 50 %) nimmt gegenüber dem Frischgewicht des Sprosses (+ 10 %) stärker zu (Abb. 3. 17 A).

Am 6. Kultivierungstag (Abb. 3. 17 B) weisen die Mutanten der Linien *OX-rop1* eine größere Wurzelmasse (160 %) als der Wildtyp auf, die Mutanten *OX-rop6* und *rop1rop6* besitzen neben einer größeren Wurzelmasse (152 % und 176 %) auch ein erhöhtes Sprossgewicht (140 % bis 146 %). Die Linie *ric4* weist 71 % der Wurzelmasse des Wildtyps auf.

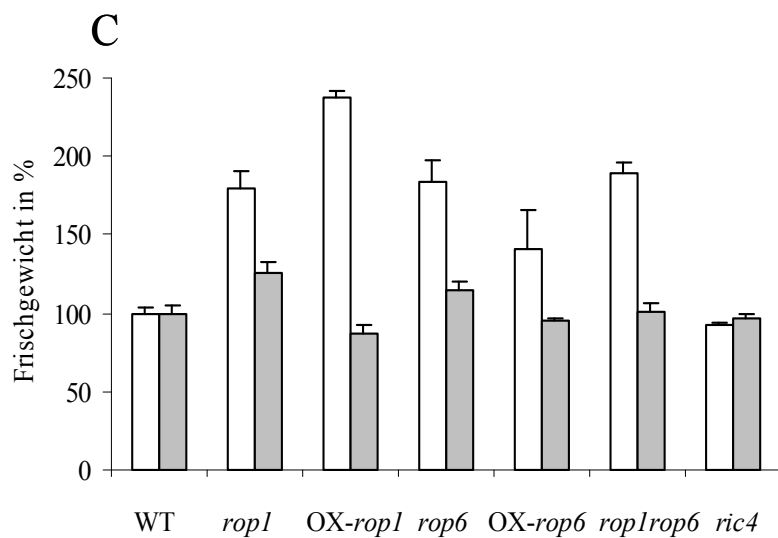
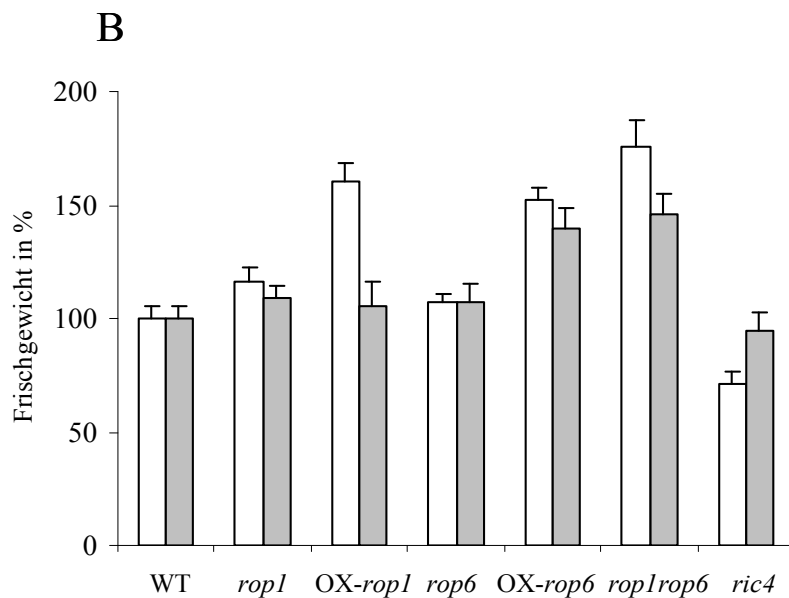
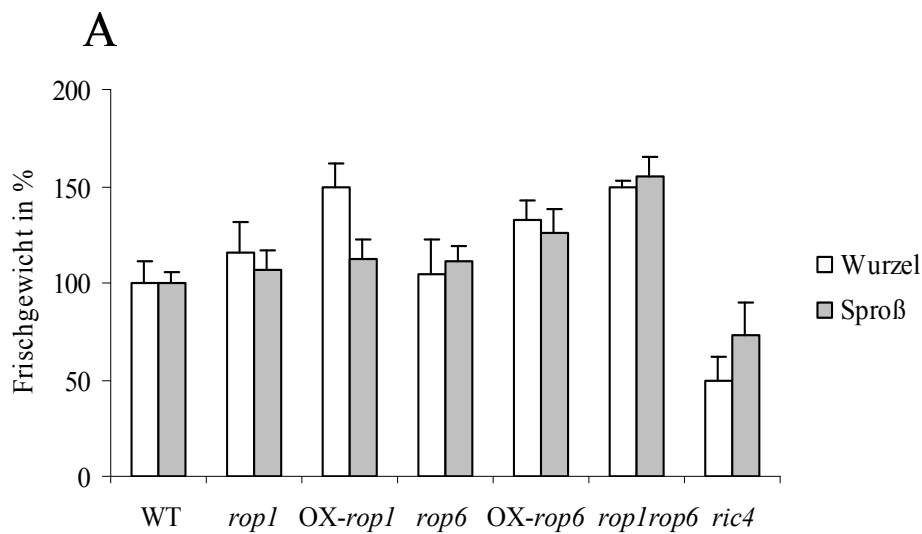


Abb. 3. 17: Wurzel- bzw. Sprossgewicht des Wildtyps und der Mutanten am 2. Tag (A), 6. Tag (B) und 14. Tag (C). Die Kultivierung des Wildtyps und der Mutanten *rop1*, *OX-rop1*, *rop6*, *OX-rop6*, *rop1rop6* und *ric4* erfolgte auf PNM-Medium. Das Frischgewicht des Wildtyps wurde mit 100 % bewertet und das Frischgewicht der Mutanten wurde im Verhältnis zu diesem betrachtet (5 unabhängige Experimente mit je 12 Pflanzen, Darstellung mit SE).

Nach 14 Tagen Kultivierung auf PNM-Medium (Abb. 3. 17 C) zeigen sich ausgeprägte Unterschiede bezüglich der Wurzelmasse zwischen Wildtyp und Mutanten mit Ausnahme der Linie *ric4*. Die Wurzelmasse der Linie *OX-rop1* ist um 137 % erhöht, die Linien *rop1*, *rop6*, und *rop1rop6* weisen 80 bis 90 % mehr Wurzelmasse als der Wildtyp auf. Die Linie *ric4* erreicht 92 % des Frischgewichts vom Wildtyp. In Abb. 3. 17 C ist eine Zunahme des Sprossgewichts in den Linien *rop1* auf 126 % und *rop6* auf 114 % verglichen mit dem Wildtyp feststellbar. Die Linie *OX-rop1* zeigt im Gegensatz dazu eine Abnahme des Sprossgewichts um ca. 13 %. Die Linie *OX-rop1* zeigt eine deutliche Verschiebung des Wurzel-/ Sprossverhältnisses zugunsten des Wurzelwachstums.

Die Interaktion mit *P. indica* führt nach 4 bis 6 Tagen zu einer Zunahme des Spross- und Wurzelgewichts bei *Arabidopsis*. Am 6. Kultivierungstag mit *P. indica* weisen mit Ausnahme der Doppelmutante *rop1rop6* alle Mutanten eine Zunahme des Frischgewichts von Spross und Wurzel auf (Abb. 3. 18 A). Der Wildtyp zeigt eine Gewichtszunahme von 30 % (Wurzel) bzw. 39 % (Spross). Die Zunahme des Frischgewichts von Spross und Wurzel ist in den Linien *rop1*, *OX-rop1* und *OX-rop6* geringer als beim Wildtyp. Die Linie *rop6* weist eine größere Zunahme der Wurzelmasse als der Wildtyp auf (52 %), der Sprosszuwachs bleibt jedoch mit 16 % hinter dem des Wildtyps (39 %) deutlich zurück. In Abb. 3. 17 B ist zu sehen, dass die Wurzelmasse von *rop6* nur gering (7 %) die Wurzelmasse vom Wildtyp übersteigt. Die alleinige *knock-out*-Mutation von *rop6* beeinflusst die Interaktion mit dem Pilz in Bezug auf eine Zunahme der Wurzelmasse zunächst positiv. Die fehlende Expression von *rop1* und *rop6* in der Doppelmutante *rop1rop6* hat einen negativen Einfluss auf die Interaktion. Das Gewicht der Wurzel zeigt keinen Zuwachs, das Sprossgewicht nimmt sogar durch die Kultivierung mit dem Pilz ab. Wie Abb. 3. 17 B zeigt, weist diese Mutante am 6. Tag ohne *P. indica* ein höheres Spross- und Wurzelgewicht als der Wildtyp auf (146 % bzw. 176 %).

Nach 14 Tagen Kultivierung mit *P. indica* zeigt der Wildtyp eine Zunahme des Spross- und Wurzelgewichts von ca. 80 %, alle Mutanten liegen weit unter diesem Wert (Abb. 3. 18 B). Auch die Zunahme des Wurzelgewichts der *rop6*-Mutanten bleibt nun deutlich hinter dem Wildtyp zurück. Auf Grund der stark verringerten Zunahme des Spross- und Wurzelgewichts durch die Kokultivierung im Vergleich zum Wildtyp konnte festgestellt werden, dass *ROP1*, *ROP6* und *RIC4* Einfluss auf die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica* haben.

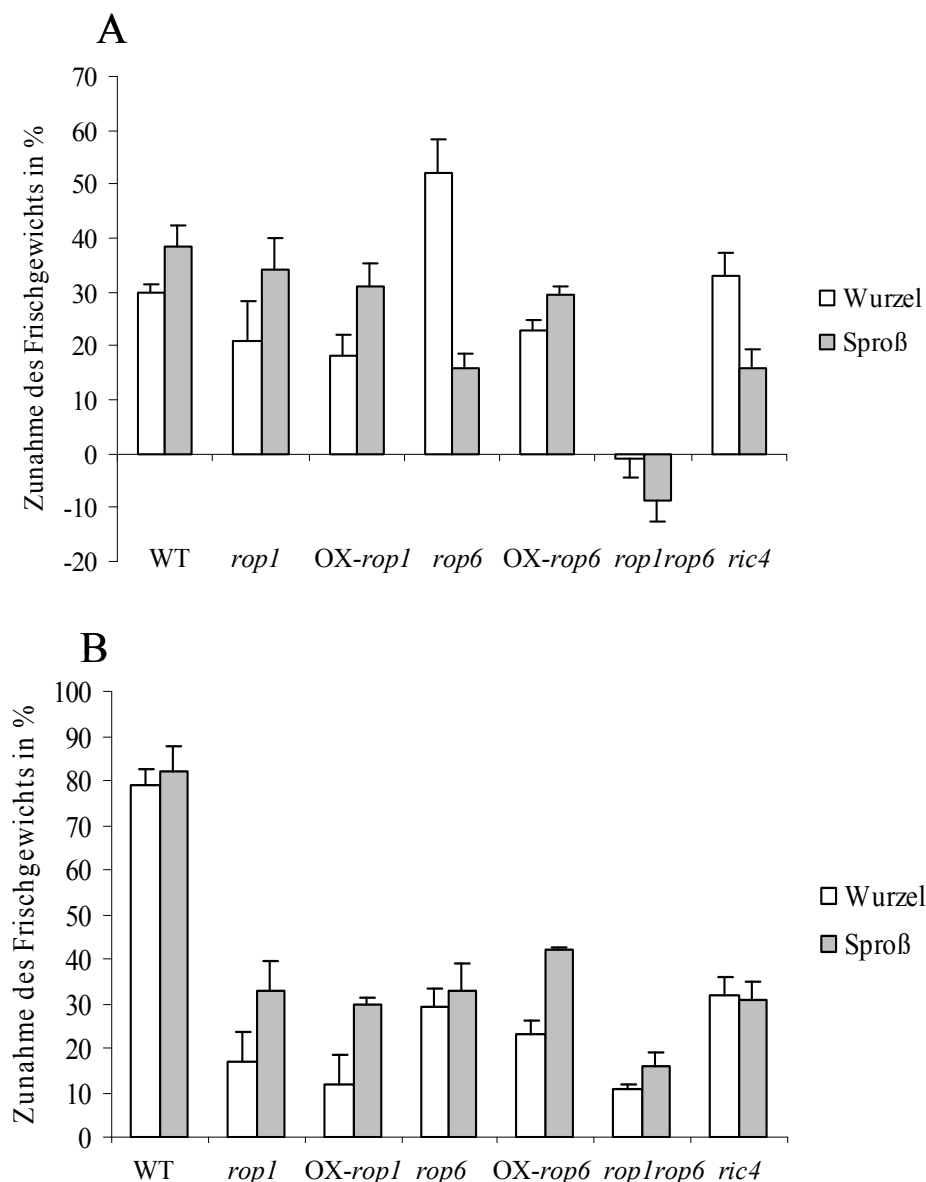


Abb. 3. 18: Zunahme des Frischgewichts des Sprosses und der Wurzel des Wildtyps und der Mutanten am 6. Tag (A) und 14. Tag (B) der Kokultivierung mit *P. indica*. Die Zunahme des Spross- und Wurzelgewichts der Mutanten *rop1*, *OX-rop1*, *rop6*, *OX-rop6*, *rop1rop6*, *ric4* und des Wildtyps wurde nach 6 bzw. 14 Tagen Kultivierung mit *P. indica* auf PNM-Medium bestimmt. Das Frischgewicht der Kontrollen wurde mit 100 % bewertet (nicht dargestellt) und mit dem Frischgewicht der mit *P. indica* kultivierten Pflanzen ins Verhältnis gesetzt (5 unabhängige Experimente mit je 12 Kontroll- bzw. 12 Versuchspflanzen, Darstellung mit SE).

3. 4. 2 Ergebnisse der auf Erde durchgeführten Interaktionsexperimente

Die Pflanzen wurden, wie in 2. 2. 4 beschrieben, in Töpfen mit Erde mit und ohne Zusatz von Pilzmyzel bis zur Samenreife kultiviert. Nach 17 Tagen, 5 Wochen (Abb. 3. 19 bis 3. 21) und 15 Wochen (Abb. 3. 22) wurden die Pflanzen fotografiert. Am 15. Tag wurde die Länge des Sprosses, der Durchmesser der Rosette und die Anzahl der Knospen, Blüten und Schoten für

jede Pflanze bestimmt. Anhand dieser Daten wurden den Mittelwerten entsprechende Pflanzen ausgewählt, dokumentiert und ihre weitere Entwicklung beobachtet. Nach 5 Wochen Kultivierung zeigte der Wildtyp einen sichtbaren Sprosszuwachs, verursacht durch den Pilz. Die Mutanten *rop1rop6* und *rop1* sind ohne *P. indica* im Durchschnitt größer als der Wildtyp ohne Pilz und werden durch diesen im Wachstum gehemmt (Abb. 3. 19 und 3. 21). Die Linie *ric4* weist eine dem Wildtyp entsprechende Größe auf und wird ebenfalls durch *P. indica* im Wachstum negativ beeinflusst (Abb. 3. 19). Die Mutanten der Linien *rop6*, *OX-rop6* (Abb. 3. 20) und *OX-rop1* (Abb. 3. 21) zeigen keinen Sprosszuwachs durch den Pilz.

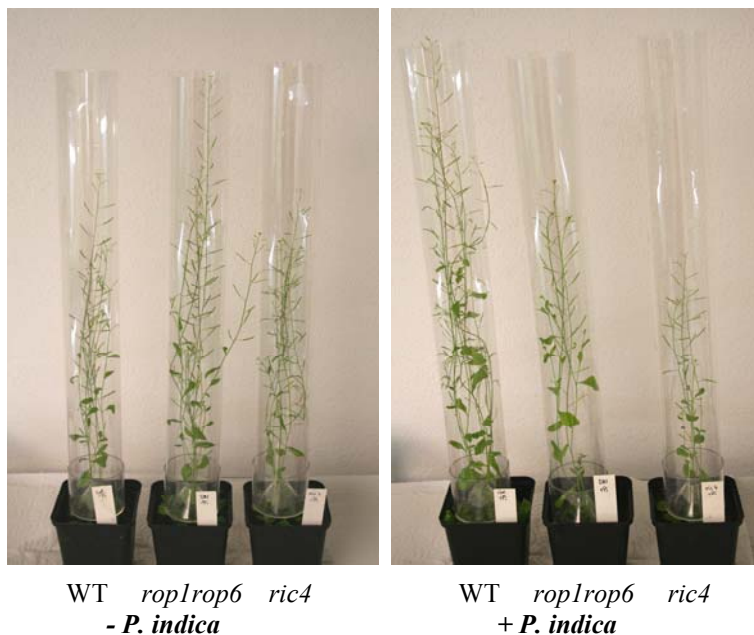


Abb. 3. 19: Kokultivierung von *Arabidopsis*, *rop1rop6*- und *ric4*-Mutanten mit *P. indica*. Nach einer Kultivierungszeit von 5 Wochen in Erde wurde der Einfluss von *P. indica* (+) im Vergleich zu den Kontrollen (- *P. indica*) auf den Sprosszuwachs dokumentiert.

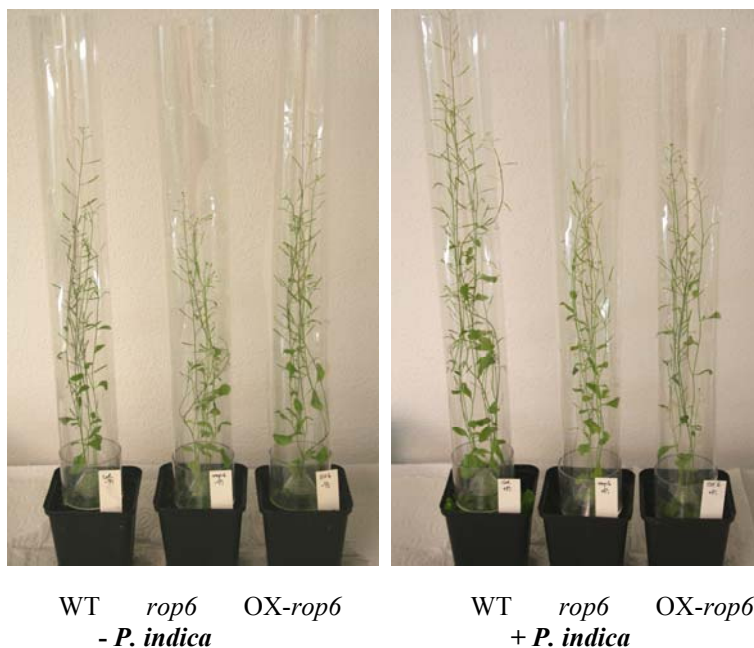


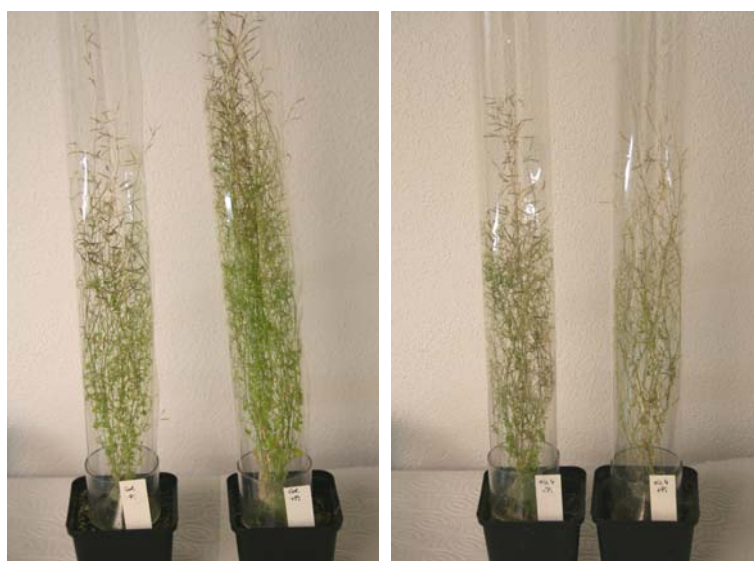
Abb. 3. 20: Kokultivierung von *Arabidopsis*, *rop6*-Mutanten und *rop6*-Überexpressionsmutanten mit *P. indica*. Nach einer 5-wöchigen Kultivierungszeit in Erde wurde der Einfluss von *P. indica* (+) im Vergleich zu den Kontrollen (- *P. indica*) auf den Sprosszuwachs des Wildtyps und der Mutanten dokumentiert.



WT *rop1* *OX-rop1*
- *P. indica*

WT *rop1* *OX-rop1*
+ *P. indica*

Abb. 3. 21: Kokultivierung von *Arabidopsis*, *rop1*-Mutanten und *rop1*-Überexpressionsmutanten mit *P. indica*. Nach einer Kultivierungszeit von 5 Wochen in Erde wurde der Einfluss von *P. indica* (+) im Vergleich zu den Kontrollen (- *P. indica*) auf den Sprosszuwachs dokumentiert.



WT WT
- *P. indica* + *P. indica*

ric4 *ric4*
- *P. indica* + *P. indica*

Abb. 3. 22: Kokultivierung von *Arabidopsis* und *ric4*-Mutanten mit *P. indica*. Nach einer Kultivierungszeit von 15 Wochen befinden sich die Pflanzen im Zustand der Samenreife. Der Einfluss von *P. indica* (+) auf den Sprosszuwachs im Vergleich zu den Kontrollen (-*P. indica*) wurde dokumentiert.

Nach 15 Wochen Kultivierung auf Erde befanden sich die Pflanzen im Zustand der Samenreife. Nur beim Wildtyp konnte ein deutlicher Sprosszuwachs durch den Pilz festgestellt werden. Bei den Mutanten *rop6*, *OX-rop6* und *OX-rop1* konnte kein Sprosszuwachs festgestellt werden, allerdings erreichten die Mutanten *rop1*, *rop1rop6* und *ric4* (Abb. 3. 22), die zunächst eine negative Beeinflussung durch den Pilz bezüglich des Sprosswachstums aufwiesen, nun die Größe der Kontrollen, demzufolge konnten sie das Wachstumsdefizit ausgleichen. Die durchschnittliche Sprossgröße der Mutanten ist am Ende der Kultivierung der Größe der Wildtyp-Kontrollpflanzen vergleichbar (Abb. 3. 22).

Mit Hilfe der in Erde durchgeführten Experimente konnten die Ergebnisse aus **3. 4. 1** bestätigt werden. ROP1, ROP6 und RIC4 nehmen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung von *Arabidopsis* und beeinflussen vor allem im noch frühen Stadium die Interaktion mit *P. indica*.

3. 4. 3 Nachweis der *P. indica*-Sporen in *Arabidopsis* und den Mutanten *rop1*, *rop6*, *rop1rop6*, *OX-rop1*, *OX-rop6* und *ric4*

Um die Besiedelung der Wurzeln durch den Pilz zu überprüfen, wurden die Wurzeln mit den in **2. 2. 14** beschriebenen Färbemethoden behandelt. Wie bereits erwähnt, sind ROP1, ROP6 und RIC4 an der Regulation des Aktinzytoskeletts von *Arabidopsis* beteiligt. Von besonderem Interesse war es herauszufinden, ob es in den *knock-out*-Linien *rop1*, *rop6*, *rop1rop6* oder *ric4* bzw. den Überexpressionsmutanten *OX-rop1* und *OX-rop6* zu einer veränderten Besiedelung durch Sporen oder Hyphen kommt. Die verwendeten Wurzeln stammten aus Versuchen, die auf PNM-Medium und auf Erde durchgeführt wurden. Bereits nach 6 bis 10 Tagen waren Pilzhypen auf der Wurzeloberfläche nachweisbar. Nach einer Kultivierungszeit von 6 Wochen auf PNM-Medium waren intrazelluläre Chlamydosporen in allen Mutanten in der Rhizodermis und sogar im Xylem vom Wildtyp und der Mutante *rop1rop6* nachweisbar (Abb. 3. 23 B, siehe Pfeil). Extrazelluläre Chlamydosporen wurden selten beobachtet. Für den Nachweis der Sporen der auf Erde durchgeführten Experimente, wurden die im Abschnitt **3. 4. 2** beschriebenen Pflanzen am Ende der Kultivierungszeit verwendet. Im Wildtyp und in allen Mutanten konnten Sporen nachgewiesen werden. Der Hauptanteil der Sporen befindet sich auf der Wurzeloberfläche. Zahlreiche Sporen befinden sich in der Rhizodermis (Abb. 3. 23 E), und passen sich der Form der Pflanzenzelle an und können diese auch vollständig ausfüllen. Die auf Erde kultivierten Pflanzen wurden wesentlich stärker vom Pilz besiedelt, als die auf PNM-Medium kultivierten Pflanzen. Ein Unterschied im Grad der Besiedelung, die zwischen jedem Individuum variierte, konnte nicht zwischen Mutanten und Wildtyp festgestellt werden. Es wurden mindestens die Wurzeln von je 5 Pflanzen pro Linie und Experiment mikroskopiert. Dabei wurde festgestellt, dass auch nach zahlreichen Waschschritten mit *A. dest.* noch Myzel und Sporen an der Wurzeloberfläche hafteten. Daher und auf Grund der veränderten Wurzel- bzw. Wurzelhaarmorphologie wurde auf einen quantitativen Nachweis des *Pitef1*-Gens von *P. indica* mittels PCR verzichtet. *Pitef1* kodiert für den Translationselongationsfaktor EF-1 α von *P. indica* (Bütehorn *et al.*, 2000). Die fehlende Expression von *rop1* und/oder *rop6* bzw. *ric4*, sowie die Überexpression von *rop1* oder *rop6* verhindern nicht das Eindringen von Chlamydosporen in die Wurzel bzw. verändern nicht die Besiedelung durch Hyphen und Sporen.

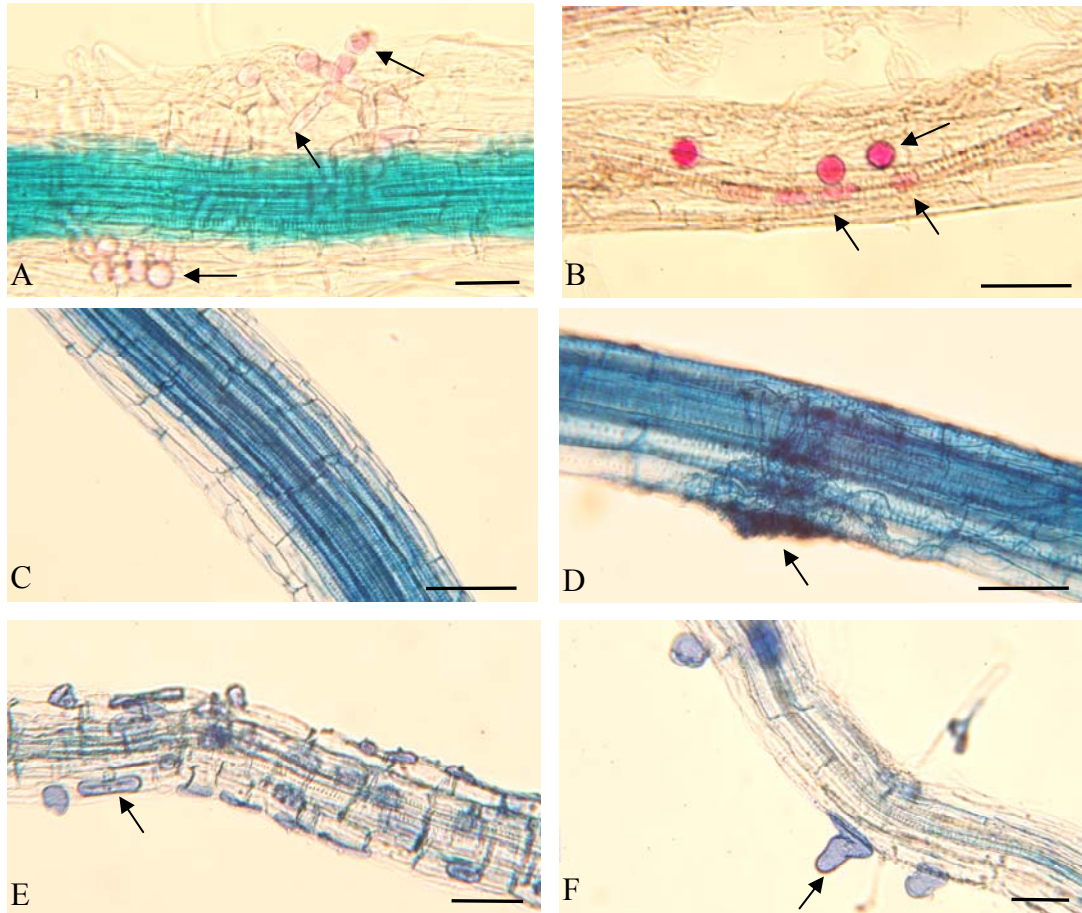


Abb. 3. 23: Nachweis von Pilzsporen in den Wurzeln des Wildtyps und der Mutanten.

A) Sporen in Wurzelhaaren des Wildtyps, das Leitgewebe ist grün angefärbt, die Sporen sind pink angefärbt, Sporenansammlung unten links befindet sich auf der Wurzeloberfläche; B) länglich-ovale Sporen im Xylem der Mutante *rop1rop6* und drei einzelne Sporen in der Rhizodermis; A und B: Die Wurzeln wurden nach 6 Wochen Kultivierung auf PNM-Medium mit dem Pianese-Farbgemisch angefärbt. C) unbesiedelte Wildtyp-Wurzel (Kontrolle); D) Pilzhyphe auf der Wurzeloberfläche des Wildtyps; E) stark intra- und extrazellulär besiedelte Wurzel von *OX-rop6*; F) möglicherweise eine eindringende Spore, die ihre Gestalt verändert; C-F: Die Wurzeln wurden nach 15 Wochen Kultivierung in Erde mit Tintenblau-Essigsäure gefärbt. Der Balken rechts unten im Bild repräsentiert eine Länge von 100 µm.

3.5 Veränderung der Struktur des Aktinzytoskeletts in den Wurzeln der Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6*

Zu den Elementen des pflanzlichen Zytoskeletts gehört neben den Mikrotubuli das F-Aktin. Das filamentöse (F)-Aktin besteht aus zwei Ketten polymerisierter G-Aktin-Monomere, die sich helixartig umeinanderwinden. Der Durchmesser eines Filaments beträgt 5-9 nm. Durch Aktin-bündelnde Proteine wie Villin, Fimbrin oder den Elongationsfaktor-1 α können F-Aktinfilamente zu höheren Strukturen wie Aktinkabeln und Aktinbündeln verknüpft werden (s. 1. 8. 2) (Hussey *et al.*, 2006).

Die Bildung von Aktinbündeln und Aktinkabeln hat Bedeutung für die Zytoplasmaströmung, Zellarchitektur, Organellenbewegung und Fixierung der Vakuole in der Zelle (Staiger *et al.*, 1994). Die Bildung von Aktinbündeln spielt auch bei der Positionierung des Zellkerns in einem bestimmten Abstand zur Wurzelhaarspitze in wachsenden Wurzelhaaren eine Rolle (Ketelaar *et al.*, 2002). In Epidermiszellen von *Arabidopsis* wurde eine Bildung von Aktinbündeln durch den Angriff von Pathogenen in kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen mit zwei *Peronospora parasitica*-Isolaten und dem Nicht-Pathogen *Phytophthora sojae* am Penetrationsort ausgelöst (Takemoto *et al.*, 2003).

Für die Visualisierung des F-Aktins am 2. und 6. Tag der Interaktion zwischen dem *Arabidopsis*-Wildtyp sowie den Linien *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* mit *P. indica* wurde das GFP-FABD2-Konstrukt verwendet (s. 2. 2. 13). Das GFP-FABD2-Konstrukt besteht aus der 2. Aktin-bindenden Domäne (ABD2) von Fimbrin 1 (*At4g26700*, *AtFim1*), an dessen N-Terminus GFP fusioniert wurde (Voigt *et al.*, 2005). *AtFim1* bindet an Aktinfilamente und verbindet diese miteinander zu höheren Strukturen. Die 2. Aktin-bindende Domäne ABD2 weist eine hohe Bindungsaffinität zu Aktinfilamenten *in vivo* auf und ist zur Beobachtung des Aktinzytoskeletts in verschiedenen Pflanzenarten und Geweben geeignet (Kovar *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). Die Transformation mit dem GFP-FABD2-Konstrukt hat keine phänotypische Auswirkung auf *Arabidopsis* (Voigt *et al.*, 2005). In Interaktionsexperimenten mit *P. indica* verhielten sich die mit dem GFP-FABD2-Konstrukt transformierten Linien *rop1*, *rop6*, *rop1rop6* einschließlich des Wildtyps wie die nicht transformierten Linien.

Untersucht wurde das Aktinzytoskelett in den Wurzeln von je 10 Pflanzen pro Linie, kultiviert mit bzw. ohne *P. indica*. Da der Pilz häufig über die Wurzelhaare in die Wurzeln eindringt, wurde vor allem die Wurzelhaarzone mikroskopisch untersucht. Dargestellt in den folgenden Bildern (Abb. 3. 24 A-H) wird der 2. Tag der Interaktion. Am 2. Tag der Kultivierung besteht noch kein physischer Kontakt zwischen Pflanze und Pilz. Die Wurzelhaarzone bzw. Differenzierungszone schließt sich der Streckungszone an, in der die Zellen durch Längenwachstum ihre endgültige Größe erreichen. In der Wurzelhaarzone kommt es zur Ausbildung von Wurzelhaaren, wobei nur Trichoblasten zur Ausbildung von Wurzelhaaren in der Lage sind.

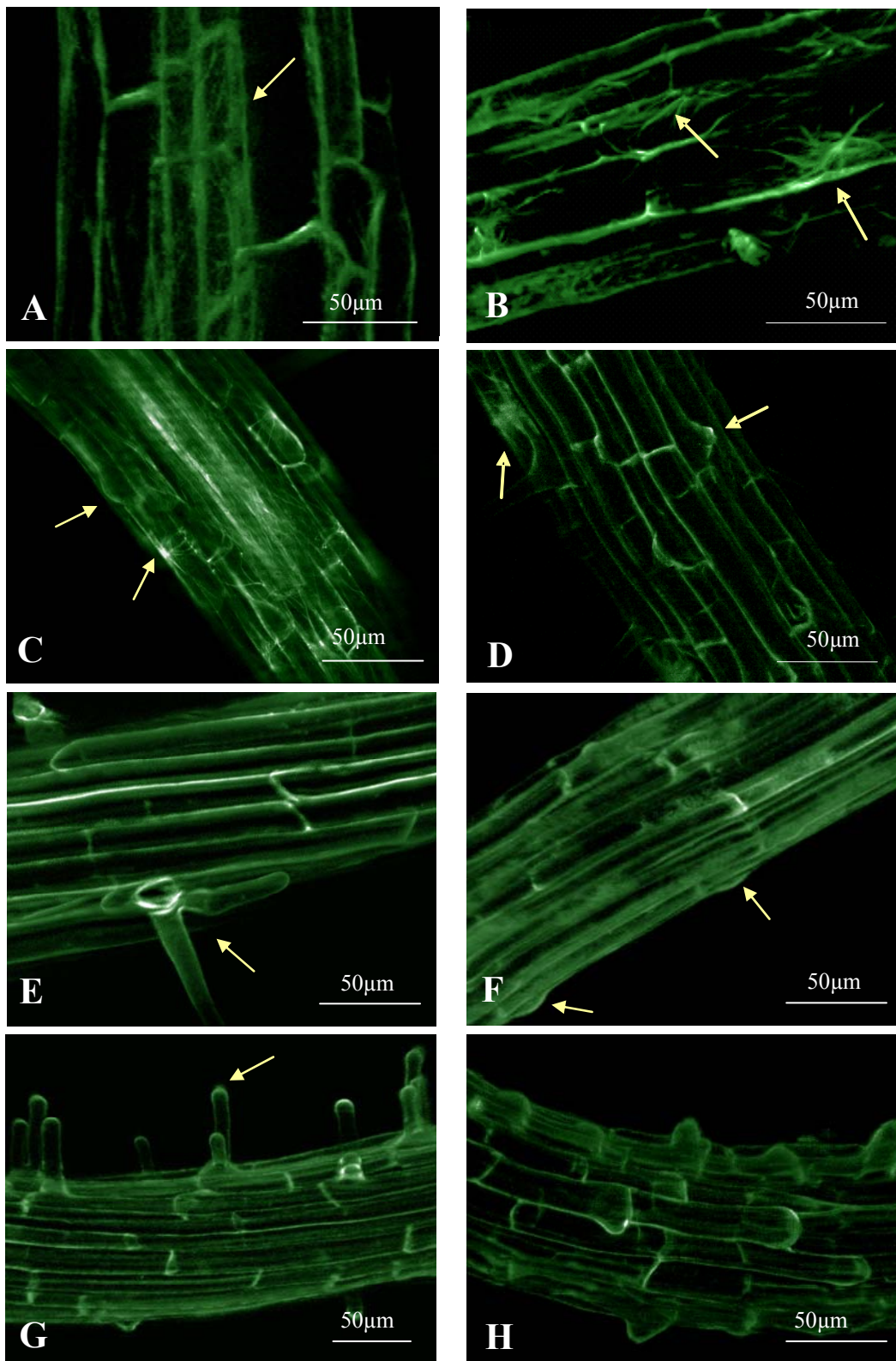


Abb. 3. 24: Visualisierung des F-Aktins in den Wurzeln des *Arabidopsis*-Wildtyps und der Mutanten. Mit Hilfe des GFP-FABD2-Konstrukts (Voigt *et al.*, 2005) wurde die Struktur des Aktinzytoskeletts im Wildtyp und in den Mutanten für den 2. Tag der Kultivierung ohne *P. indica* (- *P. i.*) bzw. mit *P. indica* (+ *P. i.*) untersucht. A: Wildtyp - *P. i.*; B: Wildtyp + *P. i.*; C: *rop1* - *P. i.*; D: *rop1* + *P. i.*; E, G: *rop1rop6* - *P. i.*; F, H: *rop1rop6* + *P. i.*

In den Rhizodermiszellen der Wurzelhaarzone sind Aktinfilamentbündel, oft in Längsrichtung, nachweisbar (Voigt *et al.*, 2005). Diese Beobachtung konnte ebenfalls in den Rhizodermiszellen des Wildtyps (Abb. 3. 24 A und B) gemacht werden.

In Abb. 3. 24 A und B ist die Zusammenlagerung des F-Aktins zu Aktinbündeln (ungeordnet, antiparallel erscheinende Strukturen) sichtbar, diese Aktinbündel traten teilweise in den mit *P. indica* kultivierten Wurzeln verstärkt auf. Auch in den Mutanten *rop1* (Abb. 3. 24 C und D) und *rop6* (nicht abgebildet) kam es zur Bildung von Aktinbündeln in Rhizodermiszellen, aber in geringerem Maße. In den Mutanten der Linie *rop1rop6* (Abb. 3. 24 E-H) konnte in keiner der untersuchten Wurzeln unabhängig von der Kultivierung die Bildung von Aktinbündeln beobachtet werden. Die Rhizodermiszellen der Doppelmutante *rop1rop6* weisen wie der Wildtyp das meist an der Zellmembran liegende diffuse F-Aktin auf (Abb. 3. 24 G, älterer Bereich der Wurzelhaarzone), wirken aber auf Grund der fehlenden Aktinbündel und Aktinstränge bzw. -kabel (parallel erscheinende Ausrichtung des F-Aktins) „leer“.

Das Aktinzytoskelett ist von großer Bedeutung für das polar ausgerichtete Wachstum der Wurzelhaare. Zunächst kommt es zu einer Auswölbung an der Stelle, an welcher ein Wurzelhaar ausgebildet wird (Abb. 3. 24 C, D, F). Diese Auswölbungen der Wurzelzellen besitzen ein ausgeprägtes Netzwerk aus F-Aktin und Aktinbündeln (Voigt *et al.*, 2005). In der Mutante *rop1rop6* konnten keine Aktinbündel an den Auswölbungen der Wurzelzellen gefunden werden. Das Auftreten von diffusem F-Aktin ist in der Mutante *rop1rop6* (Abb. 3. 24 F) jedoch im Gegensatz zu den Mutanten *rop1* (Abb. 3. 24 C, D) und *rop6* (nicht abgebildet) sehr ausgeprägt. Während des Spitzenwachstums findet man in den Wurzelhaaren des Wildtyps Aktinkabel entlang der Wachstumsrichtung, die kurz vor der Wurzelhaarspitze enden. An der Wurzelhaarspitze tritt vor allem ein Netzwerk aus feinem F-Aktin auf (Voigt *et al.*, 2005). Auch in den Mutanten *rop1* und *rop6* wurden in wachsenden Wurzelhaaren z. T. Aktinkabel nachgewiesen (nicht dargestellt), in der Doppelmutante *rop1rop6* konnten jedoch keine Aktinkabel nachgewiesen werden (Abb. 3. 24 G). In Abb. 3. 24 G befinden sich die Wurzelhaare im Längenwachstum, es ist nur feines, an der Plasmamembran lokalisiertes F-Aktin zu sehen. In Abb. 3. 24 H sind zahlreiche Wurzelhaaranlagen mit feinem, membranständigen F-Aktin zu sehen. Abb. 3. 24 G-H bestätigen die normale Insertion der Wurzelhaare am Ende der Zelle in Richtung der Wurzelspitze (Masucci und Schiefelbein, 1994) in der Mutante *rop1rop6* (s. 3. 3. 2). In Abb. 3. 24 E ist ein an der Basis verzweigtes Wurzelhaar der Mutante *rop1rop6* zu sehen.

Am 6. Tag der Interaktion (Abb. 3. 25) wurden die Wurzeln nach ihrer Lage zum Pilz in entfernt liegende und solche mit physischem Kontakt zum Pilz eingeteilt. Die Wurzeln mit direktem Pilzkontakt durchwachsen z. T. das ausgestanzte Pilzstück oder liegen diesem an. Im Zentralzylinder der Wurzel differenzieren sich zu diesem Zeitpunkt die Leitgewebe. Zunächst werden die Protophloemelemente zur Versorgung der wachsenden Wurzel ausgebildet. Mit dem Längenwachstum der Wurzelhaare beginnt die Differenzierung von

Protoxylemelementen. In den mit *P. indica* kultivierten Wurzeln des Wildtyps ist die Ansammlung von F-Aktin-Strängen im Leitgewebe besonders stark. In den Zellen der Rhizodermis sind Aktinbündel sichtbar (Abb. 3. 25 A und B). In den Wildtyp-Kontrollen war die Akkumulation des F-Aktins weniger stark ausgeprägt, als in den infizierten Wurzeln. Wie in Abb. 3. 25 C zu sehen ist, treten im Leitgewebe einzelne F-Aktin-Stränge auf und in den Zellen kommt es zur Bildung von Aktinbündeln. In einigen Wurzeln der Kontrollen war die Akkumulation des F-Aktins zu Strängen und Bündeln sehr viel schwächer ausgeprägt, als in Abb. 3. 25 C. Die Kultivierung mit *P. indica* führte in den Wurzeln des Wildtyps unabhängig vom direkt vorhandenen Kontakt zur verstärkten Akkumulation des F-Aktins zu Aktinbündeln und Aktinsträngen. In den Mutanten der Linien *rop1* und *rop6* kam es seltener in den Kontrollen und in infizierten Wurzeln zur Bildung von Aktinbündeln (Abb. 3. 25 D und E) und Aktinsträngen in der Rhizodermis und im Leitgewebe. Einige Wurzeln zeigten auch bei direktem Kontakt mit dem Pilz keine Bildung von Aktinbündeln (Abb. 3. 25 F). In den Mutanten von *rop1rop6* (Abb. 3. 25 G und H) konnten unabhängig von der Kultivierung ohne bzw. mit Pilz keine Aktinbündel oder Aktinstränge nachgewiesen werden, dies stimmt mit den Ergebnissen des 2. Tages der Interaktion überein.

Am 17. Tag der Interaktion wurden die mit *P. indica* kultivierten Wurzeln aller Linien von den Hyphen des Pilzes bewachsen und auch die zunehmende Differenzierung der Wurzel machte zufriedenstellende Aufnahmen unmöglich, aus diesem Grund wurde auf eine Auswertung verzichtet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ROP1 und ROP6 für die Assemblierung des F-Aktins zu Aktinbündeln und Aktinkabeln von großer Bedeutung sind. Das Fehlen von ROP1 oder ROP6 führt zu einer Reduktion von Aktinbündeln und Aktinkabeln in den Wurzelzellen der Mutanten. In der Doppelmutante *rop1rop6* fehlen Aktinbündel und Aktinkabel völlig. Im Wildtyp kommt es durch die Interaktion mit *P. indica* zu einer verstärkten Ausbildung von Aktinbündeln und Aktinkabeln vor allem im Leitgewebe. Eine Bildung von Aktinbündeln ist in der Doppelmutante *rop1rop6* nicht möglich, demzufolge haben die kleinen G-Proteine ROP1 und ROP6 direkten Einfluss auf die Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica*.

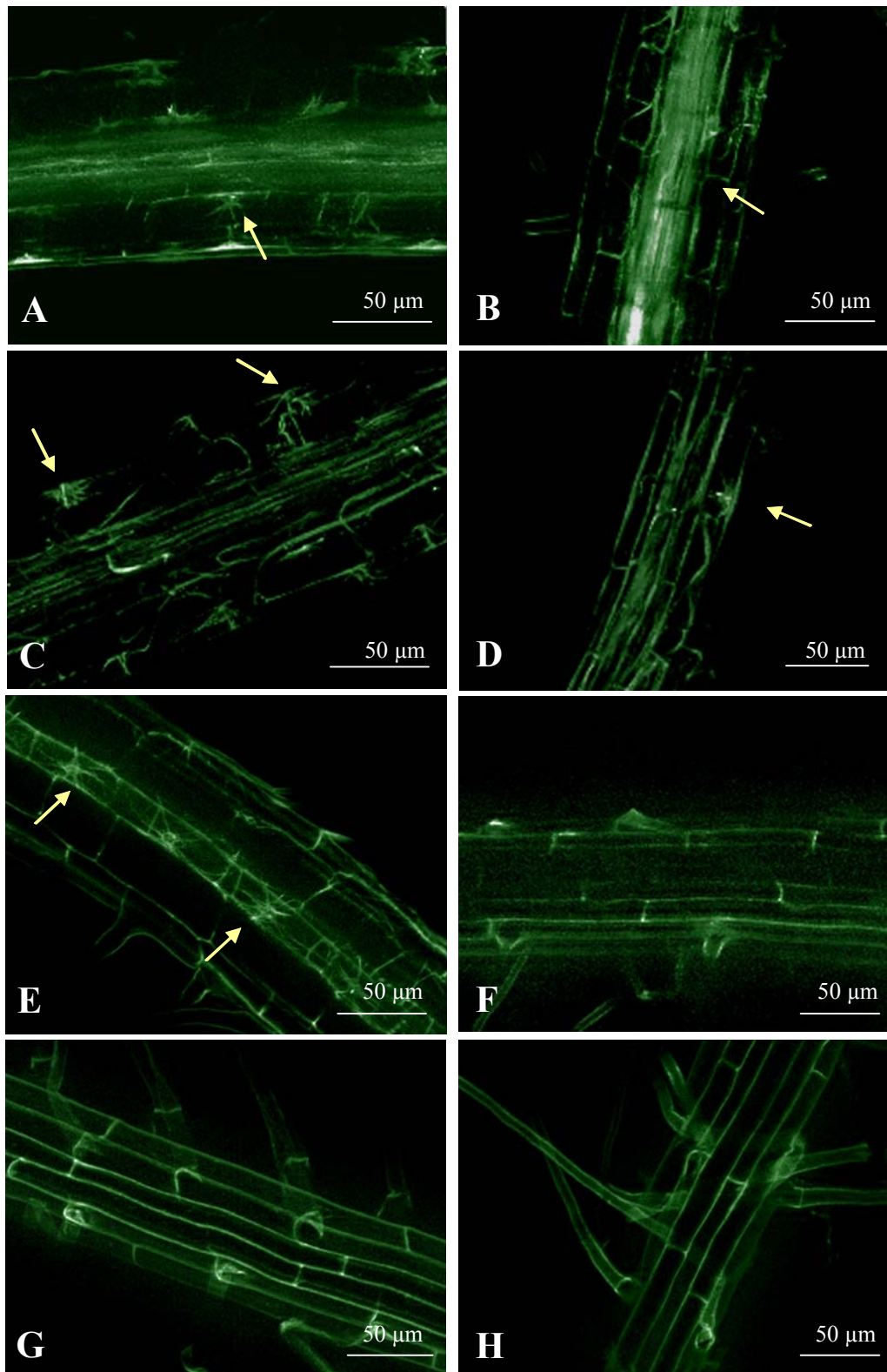


Abb. 3.25: Visualisierung des F-Aktins in den Wurzeln des *Arabidopsis*-Wildtyps und der Mutanten. Mit Hilfe des GFP-FABD2-Konstrukts (Voigt *et al.*, 2005) wurde die Struktur des Aktinzytoskeletts im Wildtyp und in den Mutanten für den 6. Tag der Kultivierung ohne *P. indica* (*-P. i.*) bzw. mit (*+P. i.*) untersucht. A: Wildtyp *+P. i.*, Wurzel hat keinen direkten Pilzkontakt; B: Wildtyp *+P. i.*, Wurzel hat direkten Pilzkontakt; C: Wildtyp *-P. i.*; D: *rop1 +P. i.*, Wurzel mit direktem Pilzkontakt; E, F: *rop6 +P. i.*, Wurzel mit direktem Pilzkontakt; G: *rop1rop6 -P. i.*; H: *rop1rop6 +P. i.*, Wurzel mit direktem Pilzkontakt

3. 6 Auswertung der *microarray*-Experimente

Für den 2. und 6. Tag der Interaktion des *Arabidopsis*-Wildtyps bzw. der Doppelmutante *rop1rop6* mit *P. indica* wurden *microarray*-Analysen durchgeführt, um festzustellen, welche Gene in *Arabidopsis* durch die Kultivierung mit dem Pilz reguliert werden (s. 2. 2. 16). Die Vergleichsanalysen der Einzelversuche von *Arabidopsis* - *P. indica*/ *Arabidopsis* + *P. indica* bzw. der Doppelmutante *rop1rop6* - *P. indica*/ *rop1rop6* + *P. indica* erfolgte mit der Affymetrix *GeneChip Operating Software* (GCOS 1.4).

Am 2. und 6. Tag der Interaktion wurden ca. 70 % der auf dem Chip enthaltenen mRNAs exprimiert (insgesamt sind 24 000 *Arabidopsis*-Gensequenzen auf dem Gesamt-Genom Chip enthalten). In Tab. 3. 2 ist der Anteil der durch den Pilz regulierten mRNAs dargestellt.

Da für jeden Zeitpunkt (2. und 6. Tag) nur eine Vergleichsanalyse durchgeführt wurde, ist ein statistischer Vergleich der regulierten mRNAs, d. h. mRNAs, die durch den Pilz hoch- bzw. herunterreguliert wurden, zwischen dem Wildtyp und der Doppelmutante *rop1rop6* nicht möglich. In der Tab. 3. 2 ist zu sehen, dass im Wildtyp nach 2 Tagen ein höherer Prozentsatz regulierter mRNAs als bei der Doppelmutante auftrat, hingegen war am 6. Tag der Interaktion in der Doppelmutante ein höherer Anteil regulierter mRNAs gegenüber dem Wildtyp feststellbar. Dies legt die Vermutung nahe, das ROP1 und/oder ROP6 eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der frühen Erkennung des Pilzes spielen könnten und eine *knock-out*-Mutation zu einer verzögerten Antwort auf den Pilz führt.

Die durchgeführten *microarrays* bildeten die Grundlage zur Auswahl von Genen, deren mRNA-Expression mittels *real-time* PCR überprüft wurde. Anhand der Chip-Daten wurde übereinstimmend mit der TAIR-Datenbank (*The Arabidopsis Information Resource*) zur Expression von mRNAs in *Arabidopsis*-Wurzeln festgestellt, dass die aus der Pathogenabwehr bekannten Proteine PR1, PR5 (*pathogenesis-related protein1* bzw. 5) (Uknes *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 2008) sowie LOX3 (*lipoxygenase3*) (Thatcher *et al.*, 2009), PDF1.2 (*plant defensin*, PR-12 Familie) (Sels *et al.*, 2008) und ERF1 (*ethylene response factor1*) in Wurzeln nicht exprimiert werden und somit eine Analyse dieser mRNAs mit *real-time* PCR nicht sinnvoll war.

In den Wildtyp-*microarrays* waren die mRNAs aller *rop*-GTPasen nachweisbar und wurden von der GCOS 1.4 Software mit *present* (nachweisbar) (s. 2. 2. 16) bewertet. Die mRNAs *rop1* und *rop6* wurden in der Doppelmutante auf Grund ihrer geringen Signalintensität von der GCOS 1.4-Software mit *absent* (nicht nachweisbar) bewertet. Die Analysen der *microarrays* des Wildtyps und der Mutante lieferten keinen Hinweis auf eine signifikante Regulation der mRNAs der *rop*-GTPasen (ROP1 bis ROP11) durch den Pilz. Die mRNAs der *ric*-Gene (*ROP-Interactive CRIB*-Motiv enthaltende Proteine, Wu *et al.*, 2001) zeigten ebenfalls keine signifikante Regulation durch den Pilz, weder im Wildtyp noch in der Doppelmutante. Die mRNAs von *ric1*, *ric2*, *ric4* und *ric10* zeigten eine geringe Signalintensität, waren aber im Gegensatz zu den Blüten-spezifischen *rics* (*ric3*, *ric5* und

ric6, Wu *et al.*, 2001) in den *microarrays* und in der quantitativen RT-PCR (nicht abgebildet) nachweisbar. Über *ric7*, *ric8* und *ric9* gaben die durchgeführten *microarrays* keine Auskunft.

Tab. 3. 2: Überblick über den Anteil regulierter mRNAs im Wildtyp und der Doppelmutante *rop1rop6*. Mit Hilfe von *microarrays* wurde der Anteil regulierter mRNAs in Wurzeln des Wildtyps und der Doppelmutante für den 2. und 6. Tag der Interaktion mit *P. indica* untersucht.

	Wildtyp - <i>P.i.</i> /+ <i>P.i.</i> 2. Tag	<i>rop1rop6</i> - <i>P.i.</i> /+ <i>P.i.</i> 2. Tag	Wildtyp - <i>P.i.</i> /+ <i>P.i.</i> 6. Tag	<i>rop1rop6</i> - <i>P.i.</i> /+ <i>P.i.</i> 6. Tag
exprimierte mRNAs	72,0 %	72,0 %	71,0 %	73,0 %
regulierte mRNAs	11,0 %	5,0 %	5,5 %	8,0 %
negativ regulierte mRNAs	5,5 %	3,0 %	2,1 %	4,2 %
positiv regulierte mRNAs	5,5 %	1,6 %	3,4 %	3,8 %

3. 7 Ergebnisse der *real-time* PCR-Experimente

Anhand der *microarrays* wurden die folgenden, z. T. aus der Pathogenabwehr bekannten Gene für eine *real-time* PCR Analyse ausgewählt: *At5g38910* (*germin-like protein*), *At2g43510* (*trypsin inhibitor*), *At2g43570* (*chitinase*), *At5g26920* (*calmodulin-binding protein*), *At2g02930* (*gstf3*), *At1g02930* (*gstf6*) und *At4g29340* (*profilin4*). Den genannten Genen war ein *change call* gemeinsam, d. h. das Expressionsverhältnis zwischen Kontrolle (- *P. i.*) und Behandlung (+ *P. i.*) unterscheidet sich signifikant voneinander (s. *change p-value*, s. 2. 2. 16). Es wurde aber auch die Regulation von mRNAs untersucht, die keine signifikanten Veränderungen aufwiesen, deren Unterschiede in den Signalintensitäten zwischen Kontrolle und Behandlung jedoch auf eine mögliche Regulation hinwiesen. Aus diesem Grund wurde mittels *real-time* PCR untersucht, ob die Mutation von *rop1* und *rop6* zu einer verstärkten Expression der mRNA von *rop2* führt, da die Signalintensität als Maß für die Häufigkeit eines Transkripts von *rop2* am 6. Tag der Interaktion ohne und mit *P. indica* in der Doppelmutante gegenüber dem Wildtyp um 40 % erhöht war. Weiterhin zeigte sich eine geringe Zunahme der Transkriptmengen von *rop3* und *rop11* im Wildtyp am 6. Tag durch *P. indica*. Die mRNAs von *ric2* und *ric4* zeigten am 6. Tag eine Abnahme der Transkriptmengen durch *P. indica* und wurden aus diesem Grund ebenfalls mit *real-time* PCR untersucht.

In Abb. 3. 26 A und B sind die Transkript-Level von *At5g38910*, einem *germin-like protein*, dargestellt. *Germine* und *germin-like proteins* (GLPs) gehören zu einer großen Multigenfamilie, über ihre Funktionen ist z. T. nur wenig bekannt, aber einige GLPs sind z. B. für die Pathogenabwehr von Bedeutung (Donaldson *et al.*, 2001, Knecht *et al.*, 2010). Durch die Interaktion mit *P. indica* kam es am 2. und 6. Tag im *Arabidopsis*-Wildtyp und in den Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* zu einer unterschiedlich starken Zunahme des

mRNA-Transkripts von *At5g38910* (Abb. 3. 26 A und B). Da die Transkriptlevel (logarithmiert zur Basis 2) extrem voneinander abweichen, wird jedes Experiment einzeln dargestellt. Im 1. Experiment für den Wildtyp (Abb. 3. 26 A) war das Transkriptlevel von *At5g38910* durch *P. indica* z. B. 158-fach (Vergleich *microarray*: $2^{7,3}$) erhöht, im 2. Experiment lag jedoch nur eine 3-fache Zunahme der Transkriptmenge vor. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Regulation von *At5g38910* unabhängig von den *knock-out*-Mutationen *rop1* und *rop6* ist und durch *P. indica* bereits in der frühen Phase der Interaktion ausgelöst wird. Ein möglicher Grund für die großen Schwankungen der Transkriptmengen kann die entwicklungsabhängige Expression von *Germinen* und *GLPs* in Keimlingen sein (Bernier *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2006). Die durchgeführten *microarrays* geben ebenfalls Hinweise auf eine entwicklungsabhängige Expression von *At5g38910*. Am 2. Tag der Interaktion lagen die Signalintensitäten im Kontrollversuch (- *P.i.*) bei 5,9 (WT) und 11,1 (*rop1rop6*), die mRNA war folglich kaum detektierbar und wurde erst durch den Kontakt mit dem Pilz extrem hochreguliert (WT: 546,5; *rop1rop6*: 121,3). Am 6. Tag der Interaktion lagen die Signalintensitäten im Kontrollversuch bei 81,1 (WT) und 88,8 (*rop1rop6*). So könnte schon ein veränderter Erntezeitpunkt der Wurzeln von wenigen Stunden die Transkriptmenge beeinflusst haben.

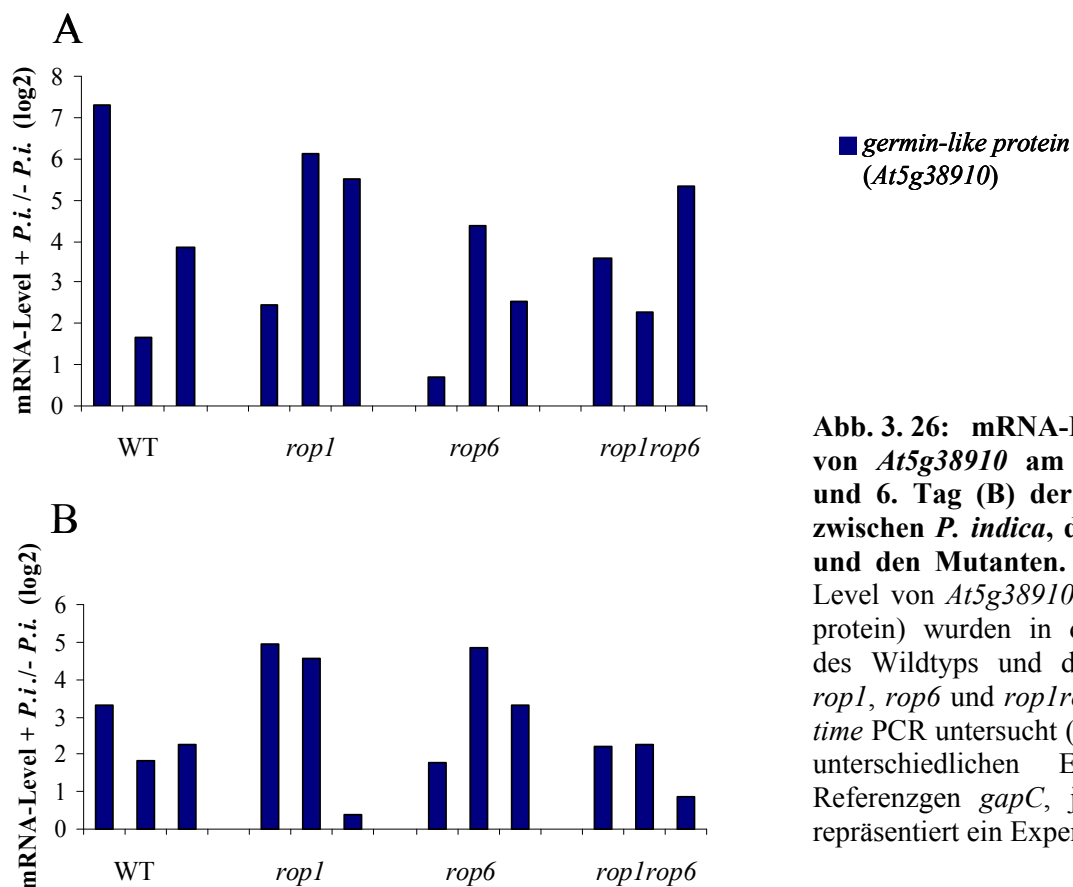


Abb. 3. 26: mRNA-Level (log2) von *At5g38910* am 2. Tag (A) und 6. Tag (B) der Interaktion zwischen *P. indica*, dem Wildtyp und den Mutanten. Die mRNA-Level von *At5g38910* (germin-like protein) wurden in den Wurzeln des Wildtyps und der Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* mit *real-time* PCR untersucht (mRNA aus 3 unterschiedlichen Experimenten, Referenzgen *gapC*, jeder Balken repräsentiert ein Experiment).

In Abb. 3. 27 A und B ist die Expression von *atti1* (*Trypsin Inhibitor Protein1*, *At2g43510*) dargestellt. Das Protein ATTI1 gehört zur Familie der Defensin-ähnlichen Proteine (DEFL). ATTI1 wird auf Grund seiner Funktion den Proteinase-Inhibitoren zugeordnet. Diese werden in vielen Pflanzenarten produziert und können z. B. von *Botrytis cinerea* gebildete Proteasen *in vitro* hemmen (Dunaevski *et al.*, 2005). In Abb. 3. 27 A ist die Regulation der mRNA von *atti1* am 2. Tag der Interaktion mit *P. indica* im Wildtyp und in den Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* dargestellt. Durch den Kontakt mit *P. indica* erfolgte im Wildtyp und in den Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* eine verstärkte Transkription von *atti1*. Im Wildtyp wurde *atti1* im Mittel doppelt so stark exprimiert wie in den Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6*. Das Fehlen einer GTPase führte demzufolge zu einer geringeren Transkription von *atti1* im frühen Stadium der Interaktion. Die fehlende Expression beider GTPasen in der Doppelmutante veränderte das Transkriptionslevel verglichen mit den einfachen *knock-out*-Mutanten kaum. Am 6. Tag der Interaktion (Abb. 3. 27 B) war *atti1* im Wildtyp weiterhin hochreguliert, die Expression war aber geringer als am 2. Tag. In den Mutanten der Linien *rop1* und *rop6* war das Transkriptlevel von *atti1* am 6. Tag höher als im Wildtyp. In der Linie *rop1rop6* war das Transkriptlevel von *atti1* mit dem des Wildtyps vergleichbar (Abb. 3. 27 B).

Ein ähnliches Bild lieferten die *real-time* Ergebnisse von *At2g43570*, einer *chitinase* und *At5g26920* (*cbp60g*), einem *calmodulin-binding protein* (Abb. 3. 27 A und B). Pflanzliche Chitinasen sind u. a. an der Abwehr von Pathogenen beteiligt, sie spielen aber auch eine Rolle in Wachstums- und Entwicklungsprozessen (Kasprzewska, 2003). Die Interaktion Calmodulin-bindender Proteine wie *At5g26920* mit Calmodulin ist Ca^{2+} -abhängig, ein Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma wird durch zahlreiche abiotische und biotische Faktoren ausgelöst (Reddy *et al.*, 2002). Die Expression von *At2g43570* und *At5g26920* (*cbp60g*) wurde durch den Pilz im Wildtyp und in den Mutanten verstärkt, die Transkription war am 2. Tag der Interaktion im Wildtyp stärker hochreguliert als in den Mutanten (Abb. 3. 27 A). Am 6. Tag war die Transkription von *At2g43570* und *cbp60g* in den Mutanten von *rop1* und *rop6* höher als im Wildtyp, in der Doppelmutante war die Transkriptmenge von *At2g43570* und *cbp60g* mit der des Wildtyps vergleichbar (Abb. 3. 27 B). Dies führt zu der Hypothese, dass eine Regulation der Transkription als Antwort auf *P. indica* durch das Fehlen beider GTPasen stärker verzögert wird.

Glutathion S-Transferasen werden durch verschiedene Stress-auslösende Faktoren in Pflanzen hochreguliert (Wagner *et al.*, 2002). Am 2. und 6. Tag der Interaktion mit dem Pilz wurde *gstf6* im Wildtyp und in den Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* verstärkt exprimiert (Abb. 3. 27 A und B). In den Mutanten ist kein wesentlicher Unterschied zur Regulation von *gstf6* feststellbar, demzufolge ist das Fehlen einer oder beider GTPasen in den *knock-out*-Mutanten für die Expression von *gstf6* ohne Bedeutung.

Am 2. Tag der Interaktion wurde *gstf3* nur im Wildtyp hochreguliert (Abb. 3. 28 A). Die Expression von *gstf3* war am 6. Tag der Interaktion in den Mutanten und im Wildtyp

reguliert, wobei die Linie *rop1rop6* eine größere Transkriptmenge aufwies als der Wildtyp (Abb. 3. 28 B).

In Pflanzenzellen ist das Aktinzytoskelett in zahlreiche wichtige Prozesse involviert, wie Zellteilung, Morphogenese, Zytoplasmaströmung, Wurzelhaarwachstum und Pathogenabwehr (Baluška *et al.*, 2000, Mathur und Hülskamp, 2002, Schütz *et al.*, 2006). Zahlreiche Proteine nehmen Einfluss auf die Struktur des Aktinzytoskeletts, dazu gehört auch Profilin (Carlsson *et al.*, 1977; Baluška *et al.*, 2000). Die *microarray*-Analysen zeigten eine Regulation für *profilin4*. In Abb. 3. 28 A ist zu sehen, das *profilin4* im Wildtyp leicht hochreguliert wurde, jedoch nicht in den Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6*. Die Linien *rop6* und *rop1rop6* zeigten eine Abnahme des *profilin4*-Transkriptlevels um 20 % am 2. Tag der Interaktion. Am 6. Tag der Interaktion wurde *profilin4* im Wildtyp weiterhin hochreguliert, für die Mutante *rop1* war auf Grund des Standardfehlers die Regulation von *profilin4* nicht auswertbar, die Mutanten *rop6* und *rop1rop6* zeigten jedoch nur eine sehr geringe (*rop6*) bzw. keine Zunahme des Transkriptlevels (*rop1rop6*) von *profilin4* (Abb. 3. 28 B).

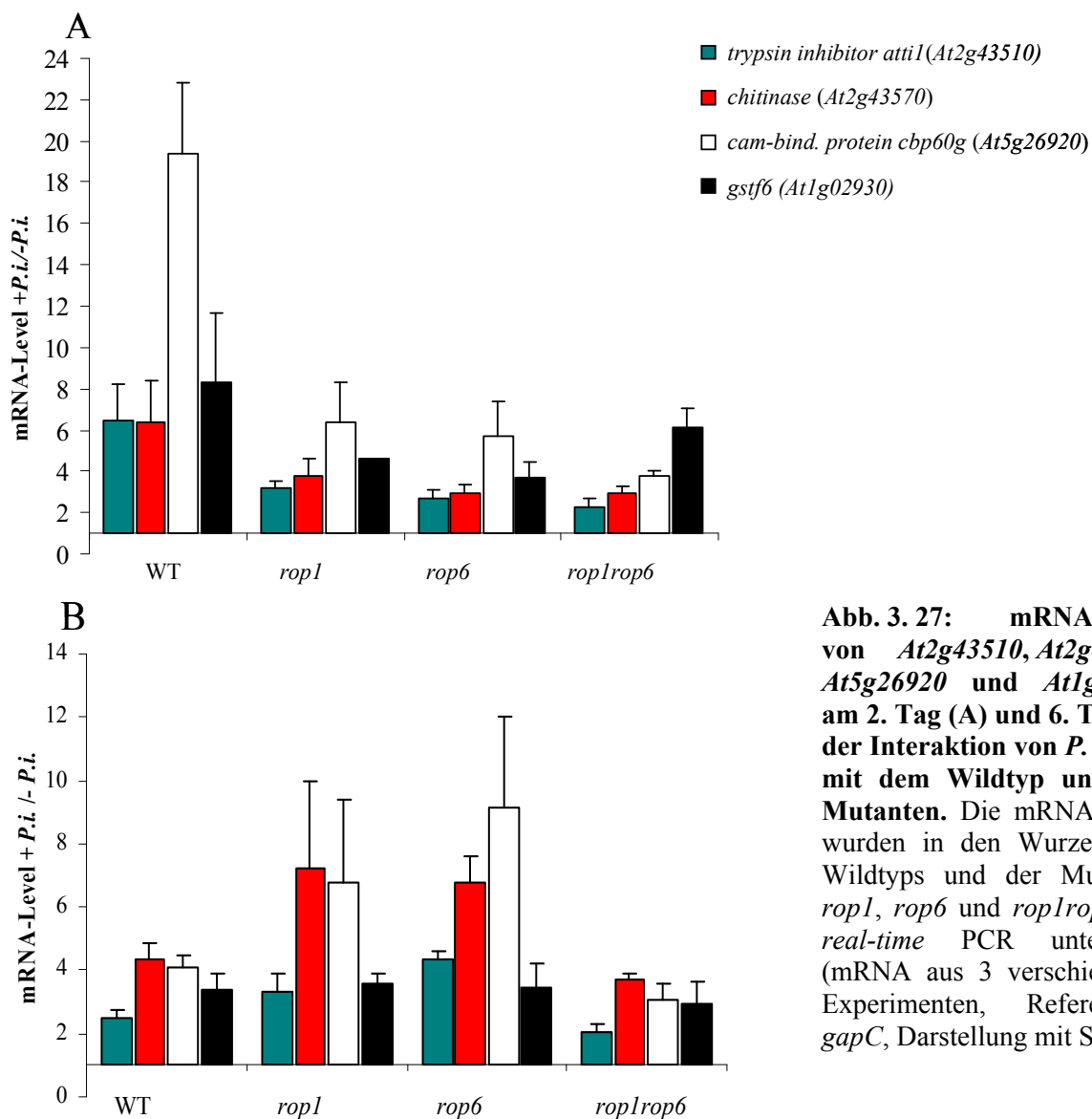


Abb. 3. 27: mRNA-Level von *At2g43510*, *At2g43570*, *At5g26920* und *At1g02930* am 2. Tag (A) und 6. Tag (B) der Interaktion von *P. indica* mit dem Wildtyp und den Mutanten. Die mRNA-Level wurden in den Wurzeln des Wildtyps und der Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* mit *real-time* PCR untersucht (mRNA aus 3 verschiedenen Experimenten, Referenzgen *gapC*, Darstellung mit SE).

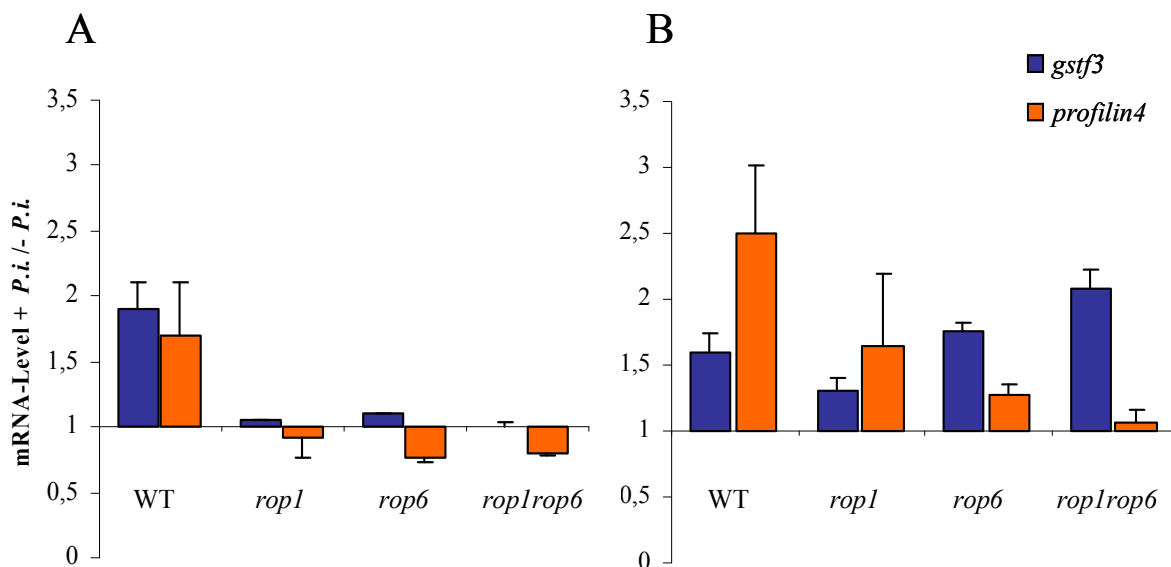


Abb. 3. 28: mRNA-Level von *At2g02930* (*gstf3*) und *At4g29340* (*profilin4*) am 2. (A) und 6. Tag (B) der Interaktion von *P. indica* mit dem Wildtyp und den Mutanten. Die mRNA-Level wurden in den Wurzeln des Wildtyps und der Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* mit *real-time* PCR untersucht (mRNA aus 3 unterschiedlichen Experimenten, Referenzgen *gapC*, Darstellung mit SE).

Das Fehlen der GTPasen ROP1 und/oder ROP6 hat den vorliegenden Ergebnissen zufolge einen Einfluss auf die durch *P. indica* verursachte mRNA-Regulation von *attil*, *chitinase At2g43570*, *cbp60g*, *gstf6*, *gstf3* und *profilin4* in den Wurzeln des *Arabidopsis*-Wildtyps und der Mutanten. Im Wildtyp erfolgte die vom Pilz ausgelöste Regulation der Transkription von *attil*, *chitinase At2g43570*, *cbp60g*, *gstf6*, *gstf3* und *profilin4* schnell. Die Expression dieser aus der Pathogenabwehr bekannten Gene war am 6. Tag weniger stark reguliert als am 2. Tag. Die *knock-out*-Mutationen von ROP1 und/oder ROP6 führten zu einer verzögerten Antwort auf den Pilz, die sich in der Zunahme der Transkription der untersuchten Gene am 6. Tag zeigte. In den *knock-out*-Mutanten wies die mRNA von *profilin 4* keine Hochregulation durch den Pilz auf (Abb. 3. 27 A, B und Abb. 3. 28 A, B).

In Abb. 3. 29 A und B sind die jeweiligen Transkriptionslevel der mRNAs von *rop2*, *rop3*, *rop11*, *ric2* und *ric4* am 2. und 6. Tag der Interaktion von *P. indica* mit der Doppelmutante *rop1rop6* zu sehen. *P. indica* hatte den *real-time* PCR-Ergebnissen zufolge keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene in der Doppelmutante. Auch im Wildtyp war eine Regulation von *rop1*, *rop2*, *rop3*, *rop6*, *rop11*, *ric2* und *ric4* durch die Interaktion mit dem Pilz nicht nachweisbar (Abb. 3. 30 A und B).

In Abb. 3. 31 A und B ist die Expression von *rop2* in der Doppelmutante gegenüber dem Wildtyp dargestellt. Das Fehlen von ROP1 und ROP6 führte nicht, wie auf Grund der *microarrays* vermutet wurde, zu einer verstärkten Transkription von *rop2* in der Linie *rop1rop6* weder in den Kontrollen (Abb. 3. 31 A) noch in den mit Pilz kultivierten Pflanzen (Abb. 3. 31 B).

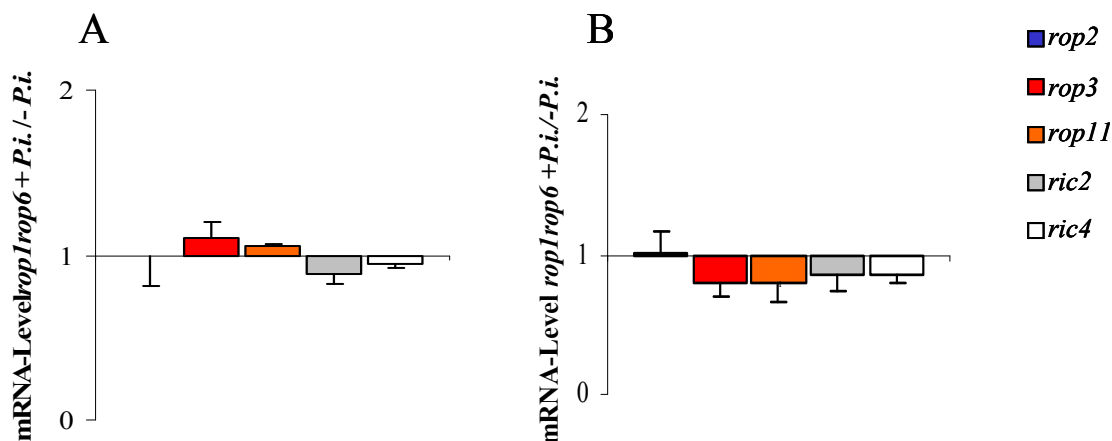


Abb. 3. 29: mRNA-Level von *rop2*, *rop3*, *rop11*, *ric2* und *ric4* am 2. (A) und 6. Tag (B) der Interaktion der Doppelmutante *rop1rop6* mit *P. indica*. Die mRNA-Level wurden in den Wurzeln von *rop1rop6* mit *real-time* PCR untersucht (mRNA aus 3 unterschiedlichen Experimenten, Referenzgen *gapC*, Darstellung mit SE).

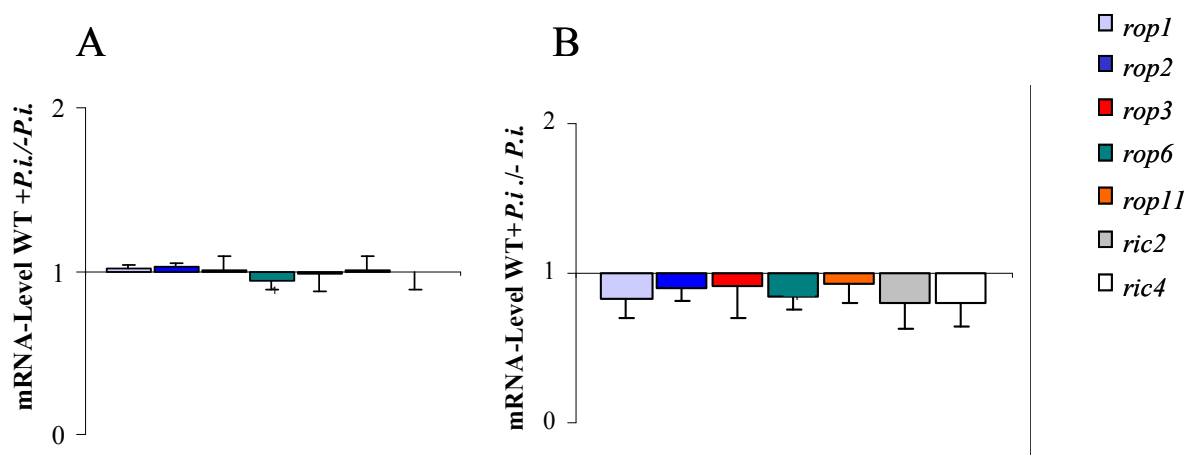


Abb. 3. 30: mRNA-Level von *rop1*, *rop2*, *rop3*, *rop6*, *rop11*, *ric2* und *ric4* am 2. (A) und 6. Tag (B) der Interaktion des Wildtyps mit *P. indica*. Die mRNA-Level wurden in den Wurzeln des Wildtyps mit *real-time* PCR untersucht (mRNA aus 3 unterschiedlichen Experimenten, Referenzgen *gapC*, Darstellung mit SE).

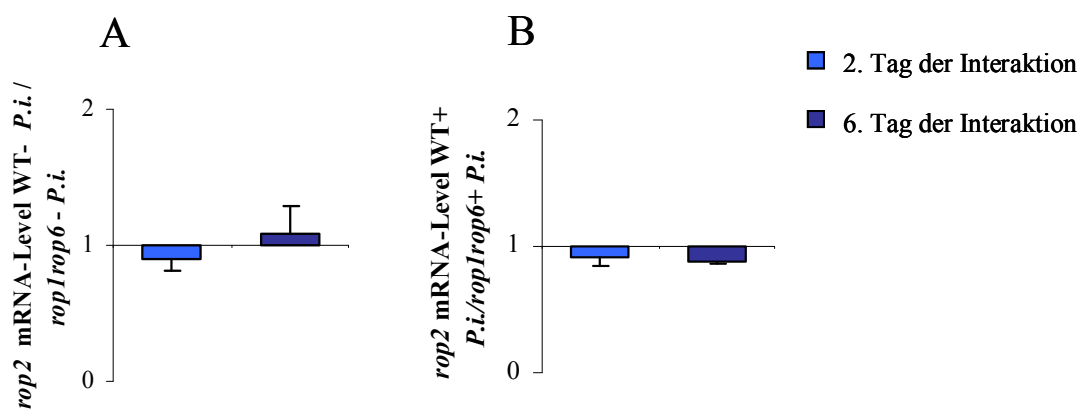


Abb. 3. 31: mRNA-Level von *rop2* im Wildtyp und in der Doppelmutante *rop1rop6* am 2. und 6. Tag der Interaktion ohne *P. indica* (A) und mit *P. indica* (B). Die mRNA-Level wurden in den Wurzeln des Wildtyps und der Doppelmutante *rop1rop6* mit *real-time* PCR untersucht (mRNA aus 3 unterschiedlichen Experimenten, Referenzgen *gapC*, Darstellung mit SE).

3. 8 Ergebnisse der Ca^{2+} -Messungen in den *Arabidopsis*-Apoaequorin-Transformanten

Veränderungen des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels werden durch zahlreiche abiotische und biotische Stimuli hervorgerufen (Knight *et al.*, 1991; Kiegle *et al.*, 2000, Blume *et al.*, 2000). Der aus *P. indica* isolierte Zellwandextrakt (ZWE) verursacht in den Wurzelzellen von *Arabidopsis*-Apoaequorin-Transformanten (s. 2. 2. 8. 2) einen schnellen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels (Vadassery *et al.*, 2009a).

In Pollenschläuchen reguliert die ROP1-GTPase die Formation eines an der Spitze des Pollenschlauches fokussierten Ca^{2+} -Gradienten (Li *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2005). Durch die Interaktion von ROP1 mit dem pollenspezifischen Protein RIC3 kommt es zur Ca^{2+} -Akkumulation an der Spitze des Pollenschlauches auf Grund eines Ca^{2+} -Einstromes. Dieser Ca^{2+} -Einstrom findet vermutlich durch Ca^{2+} -Kanäle, die sich in der Plasmamembran befinden, statt (Gu *et al.*, 2005). Die Untersuchungen von Gu und Mitarbeitern (2005) führten dazu, transgene *rop1*-, *rop6*- und *rop1rop6*-Apoaequorin-Linien innerhalb dieser Arbeit herzustellen, um eine mögliche Beteiligung von ROP1 und ROP6 bei der Regulation des Ca^{2+} -Gradienten in den Wurzelzellen durch den Zellwandextrakt (ZWE) von *P. indica* festzustellen. Die Linien wurden wie in 2. 2. 8. 2 beschrieben, durch die Kreuzung mit einer *Arabidopsis*-pMAQ2-Linie hergestellt. Die in Bezug auf die *knock-out*-Mutation von *rop1*, *rop6* bzw. *rop1rop6* homozygoten F_2 -Generationen, in denen auch das Apoaequorin-Plasmid nachweisbar war, wurden für die Messungen verwendet. In der F_2 -Generation trat eine Reduktion der Aequorin-Lumineszenz auf. Dieser Effekt wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Knight *et al.*, 1991; Ranf *et al.*, 2008). Mit den verwendeten Primern AEQ-fwd und AEQ-rev war nur ein Nachweis der pMAQ2-Sequenz möglich, eine Unterscheidung zwischen hetero-, bzw. homozygoten Apoaequorin-Linien konnte nicht getroffen werden, da keine Angaben über die Lokalisation der Plasmidsequenz im Genom vorlagen. Um die Messungen der transgenen *rop*-Linien mit dem Wildtyp vergleichen zu können, wurden mehrere Linien untersucht. Eine verwertbare Grundlumineszenz konnte dadurch erreicht werden, dass 4-6 Wurzeln für eine Messung eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde die Menge des eingesetzten Coelenterazin von 5 μl auf 15 μl /100 μl H_2O (s. 2. 2. 10) für alle Linien einschließlich des Wildtyps erhöht.

Die Transformation mit dem Ca^{2+} -Sensorprotein Apoaequorin ermöglichte die Messung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels in den transgenen Linien des Wildtyps und in den Linien *rop1*, *rop6* bzw. *rop1rop6* nach der Zugabe des ZWE von *P. indica* (Abb. 3. 32 A-D). Zunächst erfolgte die Messung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels vor der Zugabe des ZWE für 1 min. Die Grundlumineszenz liegt im Wildtyp bei 0,095 μM . Nach Zugabe des ZWE kam es zu einem schnellen Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels im Zytosol nach 1 min auf 0,27 μM für wenige Sekunden. Anschließend fiel der zytosolische Ca^{2+} -Spiegel wieder ab und erreichte nach 20 min einen Wert von 0,12 μM . Die Zugabe von H_2O verursachte keinen Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol (Abb. 3. 32 A).

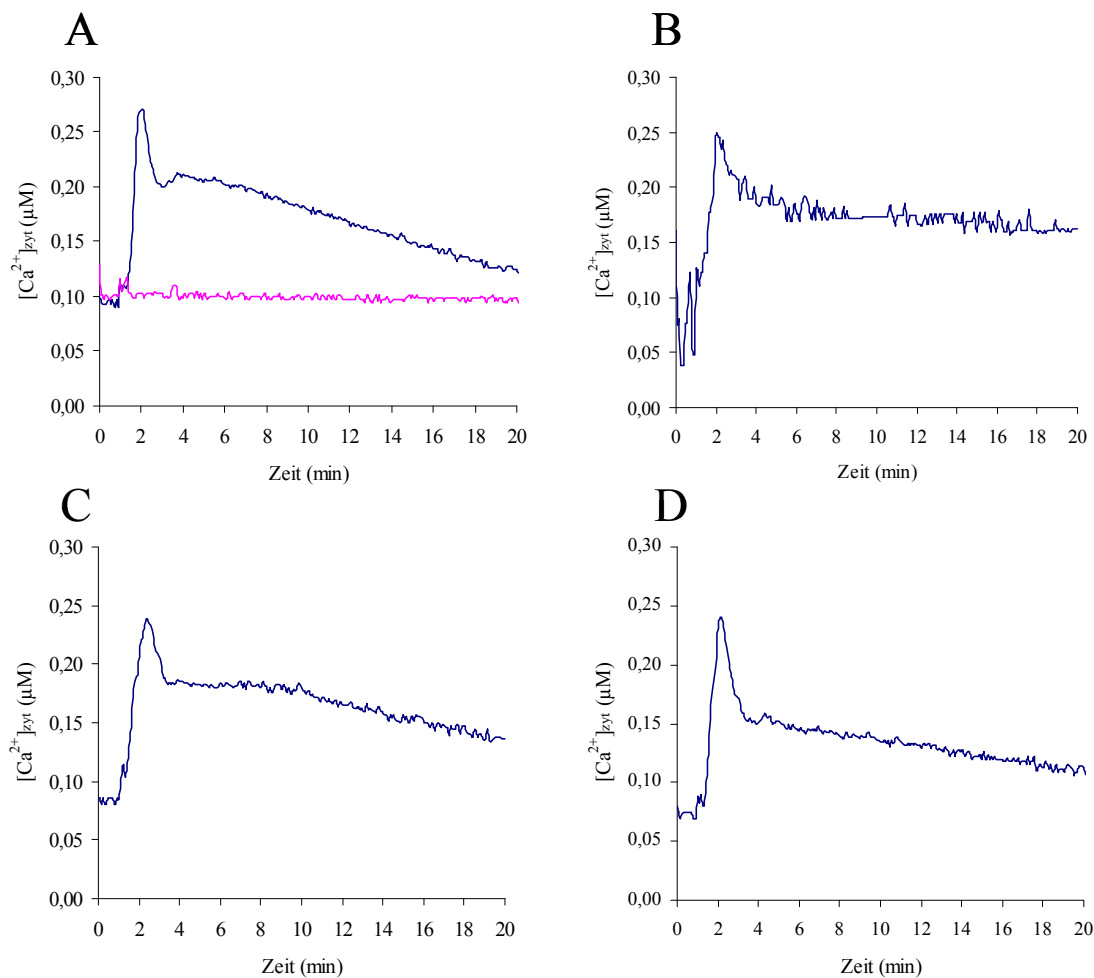


Abb. 3. 32: Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nach ZWE-Zugabe in den transgenen Wurzeln des Wildtyps und der Mutanten. Der Wildtyp und die Mutanten *rop1*, *rop6* sowie *rop1rop6* wurden mit dem Apoequorin-Plasmid pMAQ2 transformiert. In den transgenen Pflanzenwurzeln des Wildtyps (A), der Mutante *rop1* (B), *rop6* (C) und *rop1rop6* (D) wurde die Änderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ durch die Zugabe von 50 μl ZWE (Zellwandextrakt isoliert aus *P. indica*) gemessen. Die Messung des Ca^{2+} -Spiegels erfolgte alle 5 s für 20 min und wurde in RLUs (*relative light units*) berechnet. Für jedes Experiment wurden 4 Wurzeln verwendet und 4 Wiederholungen durchgeführt. Als Kontrolle wurde H_2O verwendet.

In der Abb. 3. 32 B ist der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel vor bzw. nach Zugabe des ZWE zu den Wurzeln von *rop1* zu sehen. Die Schwankungen der Grundlumineszenz (0,05-0,1) und die Schwankungen nach dem Abfall des Ca^{2+} -Gipfels sind durch die Verwendung mehrerer Wurzeln je Messung und deren z. T. reduzierte Aequorin-Lumineszenz bedingt.

Anhand der Abb. 3. 32 B und der hier nicht dargestellten Messung der Entladung des Aequorins (s. 2. 2. 10) wurde festgestellt, dass der durch den ZWE ausgelöste Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma der Wurzelzellen unabhängig von ROP1 ist. Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} 1 min nach Zugabe des ZWE auf 0,25 μM und der anschließende Abfall

des Ca^{2+} im Zytosol ist der Ca^{2+} -Signatur (Kurvenverlauf) des Wildtyps vergleichbar. Die Ca^{2+} -Signatur von ROP6 (Abb. 3. 32 C) lässt ebenfalls darauf schließen, dass ROP6 keinen Einfluss auf den Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma hat. Auch die Doppelmutante *rop1rop6* zeigte keinen veränderten Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma (Abb. 3. 32 D).

3. 9 Klassifizierung und phylogenetische Analyse der kleinen G-Proteine in *Arabidopsis*

In *Arabidopsis* wurden 93 Gene für kleine G-Proteine identifiziert. Diese werden in die 4 Familien ROP (*Rho-related proteins in plants*), RAB, ARF und RAN eingeteilt (Vernoud *et al.*, 2003). Übereinstimmend mit Vernoud *et al.* (2003) wurden in dieser Arbeit 21 GTPasen für die ARF-Familie, 11 GTPasen für die ROP-Familie und 4 GTPasen für die RAN-Familie gefunden (Abb. 3. 34). Aufgrund des Sequenzvergleichs wurde *Atlg07410*, ein Mitglied der 57 RAB-GTPasen (Vernoud *et al.*, 2003), entfernt. *Atlg07410* (RABA 2b) gehört zu den 9 RAB-GTPasen, von denen keine cDNA-Sequenz oder *expressed sequence tags* (ESTs) bekannt sind. Auf Grund seiner Struktur und funktionellen Motive wird es dennoch den RAB-GTPasen zugeordnet (Rutherford und Moore, 2002).

In der Abb. 3. 33 sind die ROP-GTPasen vergrößert dargestellt. Die ROP-GTPasen weisen eine z. T. sehr große Sequenzübereinstimmung auf, so sind ROP2 und ROP4 zu fast 95 % identisch (Yang, 2002). Die in Abb. 3. 33 farblich hervorgehobenen ROPs (ROP1 bis ROP6) werden auf Grund der großen Sequenzübereinstimmungen einer gemeinsamen ROP-Untergruppe zugeordnet.

Die Bearbeitungsschritte, die zur Berechnung des *unrooted neighbor-joining tree* notwendig waren (Abb. 3. 34), sind unter 2. 2. 17 beschrieben.

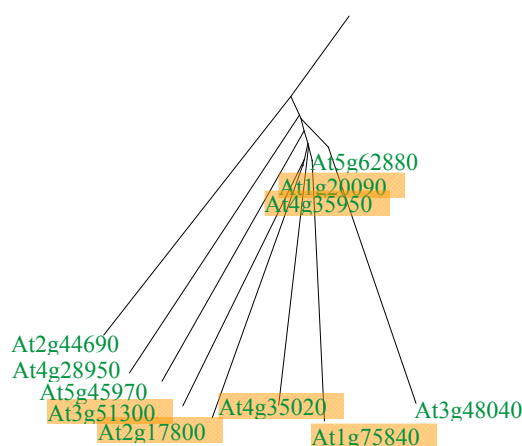


Abb. 3. 33: Ausschnitt des *neighbor-joining tree* aus Abb. 3. 34 zur vergrößerten Darstellung der ROP-GTPasen von *Arabidopsis*. ROP1 (At3g51300), ROP2 (At1g20090), ROP3 (At2g17800), ROP4 (At1g75840), ROP5 (At4g35950) und ROP6 (At4g35020) werden einer ROP-Untergruppe zugeordnet (Yang, 2002) und besitzen eine Sequenzübereinstimmung von 86-95 % (orange unterlegt).



Abb. 3.34: unrooted neighbor-joining tree der kleinen G-Proteine von *Arabidopsis*. Der Sequenzvergleich der Proteinsequenzen der 93 kleinen GTPase-Gene wurde mit dem Programm *MultAlin* (Corpet, 1988) durchgeführt. Dadurch kam es zur Entfernung des Gens *Atlg07410*, das zu den 57 Genen der RAB-Familie gehört (Vernoud *et al.*, 2003). Nach dem Sequenzvergleich erfolgte die manuelle Entfernung sogenannter “gaps“. Das führte zu einer stärkeren Bewertung konservierter Proteinsequenzen. Mit dem Programm *TreeTop* (Yushmanov und Chumakov, 1988; Brodsky *et al.*, 1995) von *GenBee* wurde ein phylogenetischer Baum mit 1000 Bootstrap-Wiederholungen berechnet und mit *Phylip* (Felsenstein, 1989) als *unrooted neighbor-joining tree* dargestellt.

4 Diskussion

Pflanzen interagieren trotz ihres meist festen Standorts mit einer Vielzahl von Organismen. Um auf diese zu reagieren, sind Mechanismen zur Wahrnehmung und Weiterleitung von Signalen erforderlich. Kleine G-Proteine sind als molekulare Schalter an der Signaltransduktion vieler Prozesse wie der Interaktion mit der Umwelt oder der Pflanzenentwicklung beteiligt. Die kleinen G-Proteine der ROP-Familie sind in zahlreiche Signalwege wie Wachstumsprozesse, die Weiterleitung von Hormonsignalen oder in die Erkennung von pathogenen und nicht-pathogenen Organismen involviert. Die Interaktion der Modellpflanze *Arabidopsis* mit *P. indica*, einem endophytisch lebenden Pilz, der das Wachstum zahlreicher Pflanzen fördert, ermöglicht durch die Analyse von Mutanten, Gene zu finden, die für die Signaltransduktion und die Ausbildung einer symbiotischen Beziehung von Bedeutung sind. In dieser Arbeit wurde anhand von *knock-out*- und Überexpressionsmutanten untersucht, ob die kleinen G-Proteine ROP1 und ROP6 für die Erkennung und Ausbildung der symbiotischen Beziehung zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* eine Rolle spielen. Da ROP-GTPasen möglicherweise funktionell redundant sein können und ROP1 mit ROP6 eine Sequenzhomologie von mehr als 94 % aufweist (Zheng und Yang, 2000), wurde die Doppelmutante *rop1rop6* hergestellt. Eine *knock-out*-Mutante des ROP-interagierenden Proteins RIC4 wurde ebenfalls untersucht. Die Mutanten wurden phänotypisch charakterisiert, und in Interaktionsversuchen wurde der Einfluss von *P. indica* auf das Wachstum und die Besiedelung der Mutanten untersucht. Die Erkennung eines pathogenen bzw. nicht-pathogenen Organismus durch die Pflanze löst u. a. einen schnellen Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma aus, führt zu Veränderungen der Genexpression und zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts. Mit Hilfe von *rop-knock-out*-Mutanten, die eine Visualisierung des Aktinzytoskeletts oder aber die Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels ermöglichen, wurde ermittelt, ob ROP1 und/oder ROP6 an diesen Prozessen beteiligt sind. Weiterhin wurde untersucht, ob die *P. indica*-induzierte Regulation ausgewählter Gene von ROP1 und/oder ROP6 beeinflusst wird.

4.1 Die kleinen G-Proteine ROP1 und ROP6 sowie das ROP-Effektor Protein RIC4 beeinflussen den Zeitpunkt der Keimung von *Arabidopsis*

Die kleinen G-Proteine ROP1 und ROP6 sowie der G-Protein-Interaktionspartner RIC4 beeinflussen die Entwicklung und den Phänotyp von *Arabidopsis*. Die Analyse der Keimung ergab, dass die GTPasen ROP1 und ROP6 den Zeitpunkt der Keimung beeinflussen (Abb. 3. 12). Die Keimung eines Samens kann in drei Phasen gegliedert werden: in Phase 1 kommt es zur Wasseraufnahme und Quellung des Samens, in Phase 2 werden metabolische Prozesse wieder aufgenommen und in Phase 3 kommt es zum Durchbruch der embryonalen Wurzel durch die Samenschale (Bewley, 1997). Es wird angenommen, dass die Ausdehnung der Keimlingswurzel durch die Zunahme der Zelllänge zustande kommt. Ob Zellteilung

ebenfalls eine Rolle bei der Keimung spielt, wird kontrovers diskutiert (Barroco *et al.*, 2005; Masubelele *et al.*, 2005). Die Wirkung von ROP1, das als pollenspezifisch exprimiert beschrieben wurde (Li *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 2005) und daher nur in Pollenschläuchen von Tabak untersucht wurde (Gu *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008), spielt bei der zeitlichen Beeinflussung der Keimung eine größere Rolle als ROP6. Die Expression von *rop1* in *Arabidopsis*-Wurzeln konnte in dieser Arbeit mit RT-PCR, *real-time* PCR und in *microarrays* unabhängig voneinander nachgewiesen werden. Vermutlich konnten Li *et al.* (1998) das mRNA-Transkript von *rop1* in Wurzeln nicht nachweisen, da die verwendeten RT-PCR-Zyklen zu gering gewählt waren (25 Zyklen). Das mRNA-Level von *rop1* ist in *Arabidopsis*-Wurzeln geringer als das von *rop6*. Dies konnte anhand der *microarray*-Daten, der RT-PCR (Abb. 3. 5) und *real-time* PCR festgestellt werden.

Untersuchungen ergaben, dass ROPs eine Rolle in der Regulation der Signalwege verschiedener Pflanzenhormone wie Auxin (Tao *et al.*, 2002; 2005), Abscisinsäure (ABA) und Brassinosteroiden spielen (Li *et al.*, 2001; Lemichez *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2005). So führte die Zugabe von ABA in DN-*rop2*-Mutanten (dominant negative Mutanten) zur Verstärkung der Samenruhe und zu einem gegenteiligen Effekt in CA-*rop2*-Mutanten (konstitutiv aktive Mutanten) (Li *et al.*, 2001). ROP2 zeigt eine Sequenzübereinstimmung von mehr als 80 % mit ROP6 und ROP1 (Li *et al.*, 1998; Zheng und Yang, 2000). Eine verstärkte Reaktion auf ABA zeigten auch *rop10-knock-out*-Mutanten. Dies wurde für den ABA-induzierten Schluss der Spaltöffnungen, die Hemmung der Samenkeimung durch ABA, die Hemmung der Zunahme der Wurzellänge des Keimlings und für die ABA-induzierte Genexpression untersucht (Zheng *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2005). Wurden die Samen der Mutanten von *rop2* und *rop10* einer Kältebehandlung bei 4 °C für 4 Tage unterzogen, keimten sie ebenso wie die Samen des Wildtyps (Li *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2002).

Für *rop1*- und *rop6*-Mutanten wurde die Keimung bisher nicht untersucht, aber die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ROP1 und ROP6 ebenfalls an der ABA-gesteuerten Dormanz beteiligt sind. Für ROP6 konnte eine Beteiligung am ABA-induzierten Schließen der Stomata nachgewiesen werden (Lemichez *et al.*, 2001). Durch die Kältebehandlung der untersuchten Mutanten und des Wildtyps (Abb. 3. 12) wurde endogenes ABA abgebaut, so dass die Keimung der Mutanten mit der des Wildtyps (siehe: Li *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2002) vergleichbar sein sollte. Die verstärkte Keimung der hier untersuchten *knock-out*-Mutanten kann durch eine verschiedenartige Empfindlichkeit auf ABA oder unterschiedliches Eingreifen in die Regulation der ABA-Signalwege hervorgerufen sein, wofür die verstärkte Keimung von *rop1*-Mutanten gegenüber den *rop6*-Mutanten sprechen würde. Die Überexpression von *rop1* und *rop6* muss nicht zu einem hemmenden, d. h. gegenteiligen Einfluss führen, da möglicherweise andere ROP-spezifische Signalwege angeschaltet werden. Wie bereits erwähnt, weisen Untersuchungen darauf hin, dass ROPs positive Regulatoren in Auxin-Signalwegen und negative Regulatoren in ABA-Signalwegen sind (Abb. 1. 2) (Nibau

et al., 2006). Die Informationen über die Regulation dieser Signalwege sind jedoch gering. Bekannt ist, dass verschiedene ROPs Auxin-abhängig und -unabhängig die Expression des Auxin-induzierbaren Promotors *DR5* in Tabak-Protoplasten stimulieren. Dazu gehören ROP1 und ROP6. Außerdem sind ROPs an der Vermittlung der Auxin-induzierten Genexpression durch den Abbau der Aux/IAA-Transkriptions-Repressorproteine beteiligt (Tao *et al.*, 2002; 2005).

Neuere Untersuchungen ergaben, dass Auxin in frühen Stadien der Keimlingsentwicklung hemmend auf die Elongation der Keimlingswurzel wirkt. ABA unterdrückt ebenfalls die Elongation der Keimlingswurzel. Dies geschieht vermutlich durch Verstärkung der Auxinsignalgebung in der Elongationszone (Belin *et al.*, 2009). Möglicherweise sind die hier untersuchten *rop-knock-out*-Mutanten empfindlich für ABA, können aber die Auxin-Signalgebung nicht fördern, welche die Elongation der frühen Keimlingswurzel hemmen würde. Die *rop1*- und *rop6*-Überexpressionsmutanten sind möglicherweise unempfindlich für ABA, so dass der beschriebene Prozess der verstärkten Auxinsignalgebung in der Elongationszone nicht ausgelöst wird.

Es wurde bisher nicht untersucht, wie sich die fehlende Expression spezifischer ROPs auf die Expression anderer ROPs auswirkt, die in die gleichen Signalwege involviert sind. Für die Samenkeimung ist die Regulation zahlreicher Prozesse von Bedeutung, in die ROPs eingreifen, wie die Regulation des Aktinzytoskeletts oder die durch Brassinosteroide verursachte Zunahme der Zelllänge (Gu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). Die Samenkeimung ist einer von mehreren Prozessen, bei dem die Interaktion von Brassinosteroiden mit anderen Pflanzenhormonen beschrieben wurde. In *Arabidopsis* kann die Keimung verschiedener Gibberellin-Biosynthese-Mutanten teilweise durch die Zugabe von Brassinosteroiden oder Gibberellin aufgehoben werden (Haubrick und Assmann, 2006). Gibberellin wirkt sich stimulierend auf die Keimung aus und wird als Gegenspieler von ABA betrachtet.

Die *knock-out*-Mutante *ric4* weist ebenfalls eine verstärkte Samenkeimung auf, dennoch zeigte diese Mutante anschließend eine Wachstumsverzögerung gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3. 17 A und B). Letztlich erreicht die *ric4*-Mutante aber eine dem Wildtyp vergleichbare Größe am Ende der Wachstumsperiode (Abb. 3. 17 C und Abb. 3. 22). RIC4 ist, wie die folgenden Beispiele zeigen, mit Wachstumsprozessen assoziiert. Ein verlangsamtes Wachstum der *ric4*-Mutante ist daher nicht verwunderlich. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein mit verschiedenen ROPs interagieren kann (s. 1. 5. 4). So wird in eingeschränkt diffus wachsenden Blattepidermiszellen RIC4 durch ROP2 aktiviert und fördert das lokale Auswachsen eines Zellbereichs durch die Zusammenlagerung von F-Aktin (Fu *et al.*, 2005). Die Zellen der Keimlingswurzel dehnen sich jedoch in ihrer Länge aus und unterscheiden sich daher vom Wachstumstyp der Pollenschläuche und der Blattepidermiszellen (Wasteneys und Galway, 2003). In Pollenschläuchen reguliert ROP1 durch die Interaktion mit RIC4 die Zusammenlagerung des F-Aktins. Die Interaktion von ROP1 mit RIC3 fördert das Auflösen dieser Strukturen in einem Ca^{2+} -abhängigen Prozess.

Durch diese beiden gegenläufigen Prozesse wird die Dynamik des F-Aktins gewährleistet und das Wachstum des Pollenschlauches reguliert (Gu *et al.*, 2005). Die mRNA von *ric3* wird ausschließlich in Infloreszenzen exprimiert (Wu *et al.*, 2001) und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit weder in den *microarrays*, noch mit RT-PCR in Wurzeln nachgewiesen werden. Welche Rolle RIC4 bei der Keimung und dem Wachstum der Keimlingswurzel spielt und mit welchen ROP(s) RIC4 interagiert und ob das Protein in weitere Signalwege (z. B. Hormonsignalwege) involviert ist, ist bisher unklar. Das Protein wirkt aber ganz offenbar regulierend auf den Keimungsvorgang. Bei den verstärkten Keimungsraten der *ric4*- und *rop*-Mutanten (*knock-out*- und Überexpressionsmutanten) könnten neben Hormonsignalwegen auch Prozesse der Aktindynamik eine Rolle spielen.

4. 2 Der Einfluss von ROP1 und ROP6 auf die Wurzel von *Arabidopsis*

Die Längen der Primärwurzeln wiesen nach 4 Tagen deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten auf (Abb. 3. 13). Es ist anzunehmen, dass sich diese Unterschiede mit Ausnahme der *ric4*-Mutante auf die Prozesse zurückführen lassen, die zur früheren Keimung geführt haben.

Verschiedene Pflanzenhormone beeinflussen die Ausbildung von Seitenwurzeln, z. B. zeigt Ethylen positive und negative Effekte auf die Ausbildung von Seitenwurzeln. Cytokinin und ABA wirken sich negativ auf die Ausbildung von Seitenwurzeln aus, wohingegen Brassinosteroide und Auxin diese positiv beeinflussen (Fukaki und Tasaka, 2009). Endogenes Auxin ist an der embryonalen und postembryonalen Entwicklung beteiligt, beeinflusst Licht- und Schwerkrafttropismen, Zellelongation, Zelldifferenzierung und Zellteilung (Fleming, 2006). Die Behandlung mit Brassinosteroiden führt zu Veränderungen der endogenen Auxin-Menge und/oder verstärkt die Auxin-Sensitivität. Das spricht für eine Vernetzung von Auxin- und Brassinosteroid-Signalwegen (Teale *et al.*, 2006). Brassinosteroide fördern vermutlich die Bildung von Seitenwurzeln durch die Stimulation des akropetalen Auxin-Transports (Bao *et al.*, 2004). ROPs sind, wie bereits erwähnt wurde, mit hoher Wahrscheinlichkeit positive Regulatoren von Auxin-gesteuerten Signalwegen. So führte die Aktivierung eines ROP-Homologs (NtRac1) aus Tabak durch Auxin zur Aktivierung Auxin-regulierter Promotoren. Durch die Überexpression von NtRac1 kam es zu einer starken Wurzelverzweigung (Tao *et al.*, 2002). *CA-rop2*- und *DN-rop2*-Mutanten zeigten eine reduzierte Länge der Primärwurzel. In *CA-rop2*-Mutanten kam es zu einer verstärkten Ausbildung von Seitenwurzeln, in *DN-rop2*-Mutanten nahm die Anzahl der Seitenwurzeln ab. Bereits die Behandlung mit niedrigen Auxin-Konzentrationen führte in *CA-rop2*-Mutanten zu einer extremen Zunahme der Seitenwurzeln, wohingegen *DN-rop2*-Mutanten keine Zunahme der Seitenwurzeln auch bei höheren Auxin-Konzentrationen zeigten (Li *et al.*, 2001).

Auxin liegt in der Pflanze hauptsächlich als inaktives Konjugat vor. Es wird in jungem Sprossgewebe und im meristematischen Gewebe an der Wurzelspitze gebildet. Auxin wird spezifisch und aktiv transportiert. Bei diesem Prozess spielen polar lokalisierte

Plasmamembranproteine, die *PINs* (Auxin-Efflux-carrier), eine wichtige Rolle. Der *PIN*-abhängige Auxintransport ist an der Regulation der Wurzel- und Organentwicklung beteiligt (Teale *et al.*, 2006). Das ROP-interagierende Protein ICR1 (Lavy *et al.*, 2007) ist für das Einschleusen von *PIN*-Proteinen an polaren Domänen der Plasmamembran mitverantwortlich (Hazak *et al.*, 2010). ROP2 beeinflusst wahrscheinlich die Lokalisation des Auxin-Efflux-carrier *PIN2* (Li *et al.*, 2005). Ob die Lokalisation von *PINs* ein vom Aktinzytoskelett-abhängiger Prozess ist, wird kontrovers diskutiert. Rahman *et al.* (2007) halten es jedoch für unwahrscheinlich, dass die Lokalisation von *PIN2* ein vom Aktinzytoskelett-abhängiger Prozess ist.

Die untersuchten *rop1*- und *rop6*-*knock-out*- und Überexpressionsmutanten einschließlich der Doppelmutante und *ric4*-Mutante zeigten keine Veränderungen bezüglich der Anzahl der Seitenwurzeln. Daraus lässt sich schließen, dass ROP1, ROP6 und RIC4 nicht an der Auxin-induzierten Ausbildung von Seitenwurzeln während dieses Entwicklungszeitpunkts beteiligt sind. Da ROPs jedoch eine gewebe- und entwicklungsabhängige Expression aufweisen können (Li *et al.*, 1998), kann nicht ausgeschlossen werden, dass ROP1 und ROP6 zu einem späteren Zeitpunkt, der für die Interaktionsexperimente mit *P. indica* keine Bedeutung hatte, Einfluss auf die hormonell gesteuerte Ausbildung von Seitenwurzeln nehmen.

4.3 ROP1 und ROP6 beeinflussen die Ausbildung von Wurzelhaaren

Die Ausbildung von Wurzelhaaren wird neben dem Pollenschlauch-Wachstum als Modell-System für das polare Wachstum von Zellen verwendet. Die Entwicklung von Wurzelhaaren lässt sich in drei Stadien gliedern:

1. die Wurzelhaarinitiation,
2. die Transition zum Spitzenwachstum und
3. das Spitzenwachstum (Dolan *et al.*, 1994).

Anhand der Analyse von Wurzelhaarmutanten konnten mehr als 40 Gene identifiziert werden, die für die korrekte Ausbildung von Wurzelhaaren von Bedeutung sind (Grierson *et al.*, 2001). Stoffe, die die Mikrotubuli-Struktur oder Aktinfilamente auflösen, aber auch Exozytose-Inhibitoren können ein Anschwellen oder Verzweigen von Wurzelhaaren auslösen (Ovecka *et al.*, 2000).

ROP-GTPasen konnten während der Wurzelhaarinitiation und an der Spitze des wachsenden Wurzelhaares an der Membran nachgewiesen werden (Molendijk *et al.*, 2001). ROP2 ist für die Wurzelhaarinitiation erforderlich (Jones *et al.*, 2002). Währenddessen befindet sich ROP2 an der Zellmembran und ist in der anschließenden Elongationsphase im Zytoplasma lokalisiert. In *scn1*-Mutanten kommt es zu Lokalisationsstörungen von ROP2. Das Gen *scn1* kodiert für ROP-GDI1 (s. 1.5.3) und reguliert vermutlich die Lokalisation von ROP2 sowie die räumliche Regulation von ROS an der Spitze des Wurzelhaares (Carol *et al.*, 2005). An der Lokalisation von ROP2 am Ende der Trichoblasten ist vermutlich auch ein Auxingradient beteiligt sein (Fischer *et al.*, 2006).

Für das Wurzelhaarwachstum ist die Bildung von ROS (*reactive oxygen species*) an der Spitze des Wurzelhaares durch die NADPH-Oxidase AtrbohC/RHD2 essentiell. Dies führt zur Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und zur Bildung eines Ca^{2+} -Gradienten an der Spitze des Wurzelhaares (Foreman *et al.*, 2003; Carol und Dolan, 2006). In der *rhd2*-Mutante kommt es zwar zur Wurzelhaarinitiation, das Spitzenwachstum bleibt jedoch aus und ein Ca^{2+} -Gradient ist nicht nachweisbar (Grierson *et al.*, 2001; Foreman *et al.*, 2003). In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass NADPH-Oxidasen durch Ca^{2+} direkt stimuliert werden können, so dass man einen Regulationsmechanismus für die NADPH-Oxidase-Aktivität annehmen kann (Sagi und Fluhr, 2001; Carol und Dolan, 2006). Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, dass die NADPH-Oxidase RHD2 direkt durch ROPs aktiviert wird. So erfolgt die Aktivierung der humanen NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten, die weitreichende Homologien zur pflanzlichen NADPH-Oxidase aufweist, durch kleine GTPasen (Babior, 1999). Auch ein homologes ROP-Protein in Reis (OsRAC1) bindet *in vivo* an die NADPH-Oxidase. ROP2 konnte in wachsenden Wurzelhaaren nachgewiesen werden (Jones *et al.*, 2002) und die Überexpression von ROP2 verstärkt die Bildung von ROS (Jones *et al.*, 2007). In den hier untersuchten *knock-out*- und Überexpressionsmutanten konnte keine Veränderung der Bildung von ROS (NBT-Färbung zum Nachweis des Superoxidanions) in Wurzelhaaren festgestellt werden. Daher ist anzunehmen, dass die untersuchten ROPs nicht in die Aktivierung der NADPH-Oxidase in Wurzeln involviert sind.

ROP2 ist in die Kontrolle verschiedener Stadien der Wurzelhaarentwicklung involviert. Die Überexpression von *rop2* führt zur Ausbildung mehrerer Wurzelhaare an einer Zelle, wirkt sich auf den Initiationsort aus und führt zu einer Zunahme der Länge der Wurzelhaare, die sich dann an der Spitze z. T. verzweigen. DN-*rop2*-Mutanten haben weniger und kürzere Wurzelhaare als der Wildtyp (Jones *et al.*, 2002). Die hier untersuchten GTPasen ROP1 und ROP6 sind für die Wurzelhaarmorphogenese ebenfalls von Bedeutung. Die Anzahl der Wurzelhaare zeigte jedoch in keiner der untersuchten Mutanten eine deutliche Veränderung (Abb. 3. 14 A). Auch der Insertionsort der Wurzelhaare wies keine Veränderung auf. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass ROP1 und ROP6 Einfluss auf die Länge der Wurzelhaare haben. Die Doppelmutante *rop1rop6* besitzt deutlich kürzere Wurzelhaare als der Wildtyp. Die *knock-out*-Mutation von *rop1* oder *rop6* führte zu einer geringeren Abnahme der Wurzelhaarlänge als bei der Doppelmutante *rop1rop6*. Das ist ein Hinweis auf eine mögliche Redundanz von ROP1 und ROP6, da sich das Fehlen beider GTPasen stärker auswirkt. Die Überexpression von ROP6 führte zu einer deutlichen Zunahme der Wurzelhaarlänge (Abb. 3. 14 B). Diese Ergebnisse sind mit den Veränderungen vergleichbar, die aus der Untersuchung der Wurzelhaarlänge von DN-*rop2*- und CA-*rop2*-Mutanten und *rop2*-Überexpressionsmutanten gewonnen wurden (Jones *et al.*, 2002).

Die Überexpressionsmutanten zeigten eine deutliche Zunahme verzweigter Wurzelhaare (Abb. 3. 15) an der Basis und an den Spitzen der Wurzelhaare (Abb. 3. 16). Jones *et al.* (2002) beobachteten eine Zunahme verzweigter Wurzelhaarspitzen an *rop2*-

Überexpressionsmutanten, aber weniger häufig, als es bei den hier untersuchten Mutanten auftrat. Dies kann auf experimentelle Unterschiede zurückzuführen sein, weist aber auf die Bedeutung von ROP1 und ROP6 für das Spitzenwachstum hin, wenngleich die Expression dieser Proteine in wachsenden Wurzelhaaren noch nicht belegt ist. Die Expression von CA-ROP4 und CA-ROP6 führte in den Wurzeln transgener *Arabidopsis*-Pflanzen zu einer Delokalisation des Ca^{2+} -Gradienten an der Spitze des Wurzelhaares und zum Anschwellen des Wurzelhaares, polares Wachstum wurde verhindert (Molendijk *et al.*, 2001). Ein Anschwellen der Wurzelhaare konnte bei den *rop1*- und *rop6*-Überexpressionsmutanten nicht beobachtet werden, dies liegt vermutlich an der Verwendung unterschiedlicher Mutanten. CA-Mutanten sind im Gegensatz zu Überexpressionsmutanten permanent aktiviert und können durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) nicht inaktiviert werden (Yang, 2002).

In *Saccharomyces cerevisiae* ist eine Signalkaskade kleiner GTPasen an der Knospenbildung beteiligt, dazu gehört die RHO-GTPase Cdc42 (*cell division cycle 42*) (Park und Bi, 2007). Eine solche Signalkaskade könnte auch bei der Ausbildung von Wurzelhaaren zugrunde liegen. Es ist anzunehmen, dass verschiedene ROPs zum Teil funktionell redundant an diesem Prozess beteiligt sind. So wirkt sich die Überexpression von ROP7 ebenfalls auf die Entwicklung der Wurzelhaare aus und scheint den Übergang von der Initiation zum Spitzenwachstum zu beeinflussen (Jones *et al.*, 2002).

ROP1 und ROP6 sind nicht wie ROP2 (Jones *et al.*, 2007) an der Initiation der Wurzelhaare beteiligt und daher vermutlich erst in die Transition zum Spitzenwachstum und/oder das Spitzenwachstum (Dolan *et al.*, 1994) involviert.

Für das Wurzelhaarwachstum ist die Dynamik des Aktinzytoskeletts und im Unterschied zum Pollenschlauchwachstum auch die Dynamik der Mikrotubuli von großer Bedeutung, um einen geordneten Vesikel- und Organellentransport zu gewährleisten (Bibikova *et al.*, 1999; Baluška *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2008). Wachsende Wurzelhaare zeigen Aktinkabel entlang der Wurzelhaarachse und an der Spitze ein feines Aktinnetzwerk. ROP2 ist an der Regulation des F-Aktin-Netzwerks an der Wurzelhaarspitze beteiligt (Jones *et al.*, 2002). Der Phänotyp der CA-*rop2*-Mutation wird durch eine Mutation in *mrh2* (*ARM domain-containing kinesin-like protein*) verstärkt. Das *ARM domain-containing mrh2*-Fragment kann Aktinfilamente binden und ist vermutlich an der Koordination von Aktinfilamenten und Mikrotubuli während des Wurzelhaarwachstums beteiligt (Yang *et al.*, 2007). Die Mechanismen der Regulation des Zytoskeletts und die Beziehung zu ROP2 sind noch unklar. Die Lokalisation von ROP-Proteinen ist unabhängig von der Dynamik des Aktinzytoskeletts, wie durch die Behandlung mit den Aktin-auflösenden bzw. den die Aktinpolymerisation hemmenden Stoffen Latrunculin B und Cytochalasin D nachgewiesen werden konnte (Molendijk *et al.*, 2001).

Die Wurzelhaarinitiation ist unabhängig vom Aktinzytoskelett (Baluška *et al.*, 2000). Die Untersuchung des Aktinzytoskeletts der mit dem GFP-FABD2-Konstrukt transformierten *knock-out*-Linien *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* zeigte eine Verminderung der Bildung von

Aktinkabeln in den Wurzelzellen der Linien *rop1* und *rop6* und ein Fehlen von Aktinkabeln in der Doppelmutante *rop1rop6* (Abb. 3. 24 und Abb. 3. 25). Während des Wurzelhaarwachstums kommt es im *Arabidopsis*-Wildtyp zur Bildung von Aktinkabeln entlang der Wachstumsachse. An der apikalen Region des Wurzelhaares treten feine Aktinstrukturen auf. *CA-rop2*- und *DN-rop2*-Mutanten zeigten Veränderungen dieser Aktinstrukturen (Jones *et al.*, 2002). Aber auch in Pollenschläuchen treten axiale Aktinkabel auf und ROP1 ist an der Regulation des an der Spitze lokalisierten F-Aktins beteiligt (Fu *et al.*, 2001). In der Doppelmutante *rop1rop6* (Abb. 3. 24 G und H) konnten in den wachsenden Wurzelhaaren keine axialen Aktinkabel nachgewiesen werden, was für eine essentielle Bedeutung von ROP1 und ROP6 bei der Dynamik des F-Aktins in Wurzeln spricht und die Abnahme der Wurzelhaarlänge verursacht haben könnte. Auch eine Beteiligung von ROP1 und ROP6 an der Exozytose könnte die Verzweigung von Wurzelhaarspitzen und das verringerte Längenwachstum der Wurzelhaare verursacht haben, da die Dynamik des F-Aktins für exozytotische Prozesse eine wichtige Rolle spielt, wie am Beispiel von ROP1 beim Wachstum von Pollenschläuchen gezeigt werden konnte (s. 1. 7) (Lee *et al.*, 2008).

Mit Hilfe von Interaktionsexperimenten zwischen dem *Arabidopsis*-Wildtyp, den Mutanten und *P. indica* sollte festgestellt werden, welchen Einfluss ROP1, ROP6 und RIC4 auf die Beziehung zu *P. indica* haben und ob ein wachstumsfördernder Effekt, der das charakteristische Merkmal für eine positive Interaktion ist, nachgewiesen werden kann. Um eine Zunahme der Spross- und Wurzelmasse schon nach wenigen Tagen feststellen zu können, wurden die Experimente auf einem für den Pilz- und das Pflanzen-Wachstum geeignetem Medium durchgeführt (s. 2. 2. 4). Zunächst wurde das Wachstum der Mutanten ohne den Einfluss des Pilzes betrachtet, um den Einfluss von ROP1, ROP6 und RIC4 auf das Wurzel- und Sprossgewicht festzustellen. Die Mutante *ric4* ist zunächst kleiner als der Wildtyp, erreicht aber am Ende der Kultivierungszeit eine dem Wildtyp vergleichbare Größe (s. 4. 1). Die *rop1*-Überexpressionsmutante zeigte eine starke Zunahme der Wurzelmasse während der gesamten Kultivierungszeit und nach 14 Tagen eine Abnahme der Sprossmasse im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3. 17 A-C). Die Verschiebung des Wurzel- und Sprossverhältnisses zugunsten der Wurzel legt die Vermutung nahe, dass die Mutante unter Trockenstress leidet, und daher das Wurzelwachstum fördert, um Wasserressourcen zu erschließen. Eine *DN-rop10*-Mutante wies einen geringeren Wasserverlust über die Blätter und eine stärkere Reaktion auf den durch ABA-induzierten Schluss der Stomata auf (Zheng *et al.*, 2002). Auch auf Ebene der Genexpression kommt es in *rop10-knock-out*-Mutanten zu Veränderungen. Als Antwort auf eine geringe ABA-Konzentration werden mehr Gene exprimiert als im Wildtyp, wobei eine Gruppe von Genen nur in der *rop10*-Mutante aktiviert wird und nicht im Wildtyp. ROP10 scheint an der Regulation von Genen, die durch geringe ABA-Konzentrationen aktiviert werden, beteiligt zu sein. Fast alle diese Gene werden auch durch abiotischen und biotischen Stress induziert (Xin *et al.*, 2005). Man kann sicher davon ausgehen, dass die Überexpression ebenfalls Einfluss auf die Expression Stress-induzierter

Gene nimmt. Untersuchungen von Lemichez *et al.* (2001) zeigten, dass ROP6 in die Schließung der Stomata involviert ist. ABA führt zur Schließung der Spaltöffnungen in *Arabidopsis*-Wildtyp-Zellen. Die Zugabe von ABA führt zur Inaktivierung von ROP6 in Abhängigkeit von der verwendeten ABA-Konzentration im Wildtyp. In *CA-rop6*-Mutanten blieben die Stomata auch nach Zugabe von ABA geöffnet. Diese Mutanten müssten unter Trockenstress leiden, da sie den Wasserverlust über die Spaltöffnungen nicht regulieren können. Das führt wahrscheinlich dazu, dass die ABA-Synthese gesteigert wird, was auch zu Veränderungen der Genexpression vor allem von Stress-assoziierten Genen führen kann. Die Auswirkungen der Mutationen auf das Spross- und Wurzelwachstum dieser *CA-rop6*- und *DN-rop6*-Mutanten wurde jedoch von Lemichez *et al.* (2001) nicht untersucht. Nach 14-tägiger Kultivierung wies auch die *rop6*-Überexpressionsmutante die Tendenz zur Verschiebung des Wurzel-/Sprossverhältnisses auf (Abb. 3.17 C). So beträgt der Sprosszuwachs einer Pflanze des Wildtyps zwischen dem 6. bis 14. Tag 10 mg und der Wurzelzuwachs 1,2 mg. In der *rop6*-Überexpressionsmutante beträgt der durchschnittliche Sprosszuwachs im gleichen Zeitraum nur 3 mg und der Zuwachs der Wurzel war mit 1,5 mg größer als der des Wildtyps (nicht dargestellt). Die Wurzelmasse der *rop1*- und *rop6-knock-out*-Mutanten nimmt während der Kultivierung ebenfalls zu, das Sprossgewicht jedoch auch, wenn auch in geringerem Maße im Vergleich zum Wildtyp. Die Doppelmutante *rop1rop6* zeigte zunächst ein höheres Frischgewicht für Spross und Wurzel als der Wildtyp, wahrscheinlich teilweise bedingt durch die frühere Keimung. Der Sprosszuwachs war nach 14 Tagen Kultivierung geringer als der Wurzelzuwachs. Die Kultivierung auf PNM-Medium in nicht luftdicht-verschlossenen Petrischalen begrenzt den Wasserverlust zunächst, so dass die Mutanten geringerem Trockenstress ausgesetzt sind. Möglicherweise ist ROP1 neben ROP10 (Zheng *et al.*, 2002) und ROP6 (Lemichez *et al.*, 2001) ebenfalls an der Schließung der Stomata beteiligt.

Wie schon erwähnt, können ROPs gewebe- und entwicklungsspezifisch exprimiert werden und funktionell redundant sein. Es ist möglich, dass an der Verschiebung des Wurzel- und Sprossverhältnisses und der starken Zunahme der Wurzelmasse weitere Hormonsignalwege wie Auxin oder Brassinolide beteiligt sind. Bisher wurde nur der Einfluss von ROP2 auf den Phänotyp von *Arabidopsis* genauer beschrieben. So sind homozygote *CA-rop2*-Mutanten z. B. Embryo-lethal, was die besondere Bedeutung von ROP2 für die Pflanzenentwicklung unterstreicht. Heterozygote *CA-rop2*-Mutanten besitzen einen etwas kleineren Spross als der Wildtyp und weisen eine verstärkte Spross-Apikal-Dominanz mit weniger Infloreszenzen auf. Der bereits beschriebene Einfluss von ROP2 auf das Wurzelsystem (s. 4.2) spricht für eine Beteiligung an Auxinsignalwegen. ROP2 ist auch, wie schon erwähnt, in die Regulation von Brassinosteroid- und ABA-Signalwegen involviert (Li *et al.*, 2001). Keine der hier charakterisierten Mutanten wies Unterschiede in der Spross-Apikaldominanz auf, wie auch in den Abb. 3.19 - 3.22 zu sehen ist oder eine veränderte Zahl von Seitenwurzeln bis zum 14.

Tag der Interaktion. Daher ist anzunehmen, dass eine Beteiligung von ROP1 und ROP6 in Auxinsignalwegen (Tao *et al.*, 2002) weniger essentiell für das Pflanzenwachstum ist.

Die Interaktion mit *P. indica* führte nach einer Kultivierungszeit von 6 Tagen zu einer Zunahme der Spross- und Wurzelmasse des *Arabidopsis*-Wildtyps. Mit Ausnahme der Doppelmutante *rop1rop6* zeigten alle Mutanten eine Zunahme des Spross- und Wurzelgewichts durch den Pilz (Abb. 3. 18 A). Diese Zunahme war jedoch geringer als die des Wildtyps, mit Ausnahme der *rop6-knock-out*-Mutante, die eine Zunahme der Wurzelmasse von 52 % gegenüber den 30 % des Wildtyps aufweist. Die Zunahme des Sprossgewichts ist jedoch deutlich geringer als die des Wildtyps mit 39 % und liegt bei 16 %. Die *ric4-knock-out*-Mutante weist eine Zunahme der Wurzelmasse von 30 % auf. Die Zunahme der Sprossmasse ist mit 15 % im Vergleich zum Wildtyp aber deutlich geringer. Die Doppelmutante *rop1rop6* wies am 6. Tag ohne *P. indica* eine um fast 80 % erhöhte Wurzelmasse gegenüber dem Wildtyp auf (Abb. 3. 17 B). Die Reaktion auf *P. indica* könnte daher eine Abwehrreaktion auf Grund der größeren Angriffsfläche für die Interaktion bzw. Besiedelung durch *P. indica* darstellen. Auch die *rop1*- und *rop6*-Überexpressionsmutanten, die ohne *P. indica* eine größere Wurzelmasse aufwiesen (Abb. 3. 17 B), zeigten eine stark verringerte Zunahme der Wurzelmasse durch den Pilz im Vergleich zur Mutante *rop6* (Abb. 3. 18 A), die eine dem Wildtyp vergleichbare Wurzelmasse am 6. Tag ohne *P. indica* aufwies (Abb. 3. 17 B). Die Mutante *ric4* wies am 6. Tag ohne Pilz eine geringere Wurzelmasse als der Wildtyp auf (Abb. 3. 17 B), erreichte aber durch die Kultivierung mit *P. indica* eine dem Wildtyp vergleichbare Zunahme des Wurzelgewichtes (Abb. 3. 18 A). Nach 14 Tagen Kultivierungszeit zeigten alle Mutanten eine Zunahme des Spross- und Wurzelgewichtes durch den Pilz, welche jedoch stark verringert im Vergleich zum Wildtyp war (Abb. 3. 18 B). Die auf PNM-Medium durchgeführten Experimente wiesen eine veränderte Reaktion der Mutanten auf den Pilz nach. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden Experimente auf Erde, dem optimaleren Lebensraum für Pflanze und Pilz, durchgeführt.

Alle auf Erde kultivierten Pflanzen wurden gleichmäßig mit Wasser versorgt. Die Überexpressionsmutanten OX-*rop1* und OX-*rop6* zeigten unter diesen Bedingungen keine Symptome von Trockenstress, obwohl die konstitutive Expression von *rop6* das Schließen der Spaltöffnungen beeinträchtigt (Lemichez *et al.*, 2001). Beide Überexpressionslinien zeigten ein dem Wildtyp vergleichbares Sprosswachstum (Abb. 3. 20 und Abb. 3. 21).

Bei der Kultivierung von *Arabidopsis* mit *P. indica* auf Erde blieb der Sprosszuwachs durch den Pilz bei allen Mutantenlinien aus, nur der Wildtyp reagierte positiv auf *P. indica*. Die Mutanten *rop1*, *rop1rop6* und *ric4* zeigten sogar eine durch den Pilz verursachte Hemmung des Sprosswachstums (Abb. 3. 19 - 3. 22), welches aber bis zum Ende der Kultivierungszeit ausgeglichen werden konnte, so dass die mit *P. indica* infizierten Pflanzen eine Endgröße erreichten, die den Kontrollen entsprach. *P. indica* kann sich als bodenbewohnender Pilz wesentlich besser in der Erde vermehren als auf einem Medium, das seinen

Wachstumsansprüchen nur teilweise genügt. Dies wurde auch bei den durchgeführten Sporenfärbungen festgestellt. In allen Mutanten und im Wildtyp konnten Sporen nachgewiesen werden, jedoch variierte der Grad der Besiedelung stark zwischen den einzelnen Individuen. Die Wurzeln aller in Erde kultivierten Pflanzen wiesen eine extrem hohe Sporendichte insbesondere auf der Wurzeloberfläche auf. Es konnten in einigen Fällen Sporen im Leitgewebe der Wurzeln nachgewiesen werden (Abb. 3. 23 B). Bisher wurde nur eine Besiedelung der Wurzelrinde beobachtet (Varma *et al.*, 1999). Die Abnahme des Sprossgewichts in der Doppelmutante *rop1rop6* und der Mutante *ric4* könnte durch eine anhaltende Abwehrreaktion der Mutanten auf den Pilz verursacht sein. Das Gleichgewicht, das in einer mutualistischen Beziehung zwischen der Pflanze und dem Pilz vorliegt, kann durch eine übermäßige Besiedelung durch den Pilz gestört werden und zu einer Abwehrreaktion der Pflanze führen (Kogel *et al.*, 2006; Sherameti *et al.*, 2008b; Oelmüller *et al.*, 2009). In den Überexpressionsmutanten kam es ebenfalls zu keiner Wachstumszunahme durch die Kultivierung mit *P. indica*. Eine Wachstumsverzögerung durch den Pilz, wie es für die Mutanten *rop1*, *rop1rop6* und *ric4* beobachtet werden konnte, war in den Überexpressionsmutanten jedoch nicht nachweisbar. Das führte zu der Annahme, dass die Abwehrreaktion auf den Pilz weniger ausgeprägt war.

Ist die normale Besiedelung einer Pflanze durch einen Symbionten beeinträchtigt, kann das ebenfalls Auswirkungen auf den Phänotyp der Pflanze haben. So ist die reguläre Besiedelung von *Lolium perenne* durch *Epichloë festucae* auf Grund der *racA*-*knock-out*-Mutation des Pilzes beeinträchtigt. Dies hat u. a. Auswirkung auf die Spross-Apikaldominanz der Pflanze. Die pilzliche GTPase RacA ist für die Aktivierung der NADPH-Oxidase NoxA verantwortlich. NoxA reguliert durch die Produktion von ROS das Hyphenwachstum im Symbiosepartner (Tanaka *et al.*, 2008). Eine Mutation von *P. indica* wird jedoch nicht angenommen, da die inokulierten Wildtyp-Pflanzen einen normalen Sprosszuwachs zeigten.

Bei der Interaktion von Pflanzen mit Mikroorganismen kommt es häufig zu Eingriffen in den Phytohormonhaushalt der Pflanze durch pilzliche Hormone oder andere Botenstoffe. So beeinflusst ABA Nod-Faktor- und Zytokinin-Signalwege während der Knöllchenbildung zwischen *Sinorhizobium meliloti* und *Medicago truncatula* (Ding *et al.*, 2008). Für *P. indica* konnte die Bildung geringer Auxinkonzentrationen (Vadassery *et al.*, 2008; Sirrenberg *et al.*, 2007) nachgewiesen werden. Dies scheint jedoch nicht die Ursache für den wachstumsfördernden Effekt zu sein, wie die Untersuchung von Mutanten zeigte (Vadassery *et al.*, 2008). Hingegen ist Zytokinin für den wachstumsfördernden Effekt vermutlich von Bedeutung (Vadassery *et al.*, 2008). Eine Beeinflussung des Phytohormon-Metabolismus von Gibberellin, Auxin und ABA auf Ebene der Genexpression konnte in den mit *P. indica* kultivierten Wurzeln der Gerste nachgewiesen werden (Schäfer *et al.*, 2009) und könnte auch für die Interaktion zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* von Bedeutung sein. Wie schon erwähnt, sind ROPs positive Regulatoren in Auxin-Signalwegen und negative Regulatoren in ABA-Signalwegen. So verändert die *knock-out*-Mutation von *rop10* die ABA-induzierte

Expression mehrerer Gene, die auch durch abiotischen und biotischen Stress induziert werden (Lemichez *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2002; 2005; Zheng *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2005).

ROP6 ist neben anderen ROPs in ABA-regulierte Signalwege involviert (Lemichez *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2002). Welche Rolle die hier untersuchten ROPs für die Regulation des Phytohormonhaushalts spielen, kann auf Grund der wenigen Informationen über ROPs in Hormonsignalwegen (Tao *et al.*, 2002; 2005; Zheng *et al.*, 2002) und ihrer teilweise redundanten Funktionen sowie der gegenseitigen Beeinflussung von Hormonsignalwegen nicht festgestellt werden. Weiterhin sind die Informationen darüber, in welchem Umfang der Pilz in den Phytohormonhaushalt der Pflanze eingreift, sehr beschränkt. Mit Hilfe der durchgeführten Interaktionsexperimente wird jedoch deutlich, dass die kleinen G-Proteine ROP1, ROP6 und das ROP-Interaktionsprotein RIC4 für die mutualistische Beziehung zu *P. indica* von großer Bedeutung sind.

4.5 *P. indica* beeinflusst die Transkription verschiedener Gene im *Arabidopsis*-Wildtyp und in den Mutanten differentiell

Mit Hilfe von *microarrays* für den 2. und 6. Tag der Interaktion konnte festgestellt werden, dass die Genexpression im Wildtyp und in der Doppelmutante *rop1rop6* durch *P. indica* reguliert wird. Nach 2 Tagen lag im Wildtyp ein höherer Prozentsatz regulierter mRNAs vor als in der Doppelmutante. Am 6. Tag wies dagegen die Doppelmutante den größeren Anteil regulierter mRNAs im Vergleich zum Wildtyp auf (Tab. 3. 22). Das legte die Vermutung nahe, dass ROP1 und/oder ROP6 eine entscheidende Rolle für die *P. indica*-induzierte Genexpression spielen und eine *knock-out*-Mutation zu einer verzögerten Reaktion auf den Pilz führen könnte. Zahlreiche aus der Pathogenabwehr bekannte Gene wie *pdf1.2*, *pr1* und *pr5* (Sels *et al.*, 2008; Uknes *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 2008) wurden in den Wurzeln zu diesem Entwicklungszeitpunkt (9. oder 11. Tag nach der Keimung, dass entspricht dem 2. bzw. 6. Tag der Interaktion, s. 2. 2. 4) in den *microarrays* nicht exprimiert und wurden daher nicht untersucht (s. 3. 6).

Um die aus den *microarrays* erhaltenen Daten zu überprüfen, wurden *real-time* Experimente für den Wildtyp, die Doppelmutante *rop1rop6* und die *knock-out*-Mutanten *rop1* und *rop6* durchgeführt. Bei den untersuchten Genen handelte es sich um das *germin-like protein* *At5g38910*, das Trypsin Inhibitor Protein1 *atti1*, das Calmodulin-bindende Protein *cbp60g*, die Chitinase *At2g43570*, die Glutathion S-Transferasen *gstf3* und *gstf6* sowie *profilin4*. Diese Gene wurden ausgewählt, da sie durch *P. indica* eine starke Regulation im Wildtyp und eine veränderte Regulation in der Doppelmutante aufwiesen.

Das *germin-like protein* (GLP) *At5g38910* wurde durch den Pilz im Wildtyp und in den Mutanten *rop1*, *rop6*, *rop1rop6* extrem hochreguliert (Abb. 3. 26 A und B), die auftretenden Schwankungen der Transkriptmengen werden vermutlich durch die entwicklungsabhängige Expression von *Germinen* und *GLPs* hervorgerufen (Bernier *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2006). *Germin* und *germin-like proteins* gehören zu einer großen Multigenfamilie, über ihre

Funktionen ist z. T. nur wenig bekannt, aber einige *GLPs* sind z. B. für die Pathogenabwehr von Bedeutung (Donaldson *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2006; Knecht *et al.*, 2010). *GLPs* können die Besiedelung von Gerstenblättern durch den pathogenen Pilz *Blumeria graminis* begrenzen und einige *GLPs* werden durch die Infektion mit *B. graminis* verstärkt exprimiert (Zimmermann *et al.*, 2006). *GLPs* zeichnen sich im Gegensatz zu den *Germinen* durch eine hohe Heterogenität der Aminosäuresequenzen aus. Über das hier untersuchte *GLP* (*At5g38910*) sind nur wenige Informationen verfügbar, vermutlich handelt es sich um ein *germin-like protein* der Unterfamilie 1, Mitglied 9, das mit hoher Wahrscheinlichkeit im extrazellulären Raum bzw. im Apoplasten lokalisiert ist (<http://www.uniprot.org/>). Das Protein besitzt wahrscheinlich keine Oxalatoxidase-Aktivität. Von verschiedenen Pflanzenspezies, wie z. B. Gerste oder Weizen ist bekannt, dass *GLPs* durch ihre Oxalatoxidase-Aktivität H_2O_2 produzieren und dadurch verschiedene Abwehrreaktionen, wie eine Veränderung der Zellwandstruktur oder einen *oxidative burst* als Antwort auf ein Pathogen hervorrufen können (Christensen *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2006).

Das Protein *ATTII* ist auf Grund seiner Struktur vermutlich ebenfalls im extrazellulären Raum und im Endomembransystem lokalisiert (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Es gehört zur Familie der Defensin-ähnlichen Proteine (DEFL) und ist ein Proteinase-Inhibitor. Diese werden in vielen Pflanzenarten produziert und können z. B. von *Botrytis cinerea* gebildete Proteasen *in vitro* hemmen (Dunaevski *et al.*, 2005). In *Arabidopsis* und in *CUTE*-Mutanten wird *ATTII* nach Inokulation mit *Botrytis cinerea* verstärkt exprimiert. *Arabidopsis*-Transformanten, die *ATTII* überexprimieren, sind resistenter gegen eine Infektion mit dem Pathogen *B. cinerea* (Chassot *et al.*, 2007).

Die Expression des Calmodulin-bindenden Proteins CBP60g wird in *Arabidopsis* durch die Infektion mit einem pathogenen Stamm von *Pseudomonas syringae* und durch *pathogen-or microbe-associated molecular patterns* (*PAMPs* bzw. *MAMPs*) hochreguliert. *Knock-out*-Mutanten von CBP60g lieferten auch Hinweise auf eine Beteiligung an der Aktivierung des Salizylsäuresignalwegs und weisen geringere Salizylsäurekonzentrationen durch *MAMPs* auf (Wang *et al.*, 2009). Das CBP60g besitzt im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Familie keine Calmodulin-bindende Domäne im C-terminalen Teil sondern im N-terminalen Teil des Proteins. Die Interaktion Calmodulin-bindender Proteine mit Calmodulin ist Ca^{2+} -abhängig (Reddy *et al.*, 2002).

At2g43570 gehört zu den putativen Endochitinasen, welche β -1,4-glykosidische Bindungen im Inneren eines Chitin-Moleküls hydrolysieren. *At2g43570* ist im Apoplasten und in der Zellwand lokalisiert. Vermutlich ist dieses Protein in der Lage, durch posttranslationale Modifikationen von Glykoproteinen an Umbauprozessen der Zellwand teilzunehmen (Minic *et al.*, 2007). *At2g43570* wird wahrscheinlich durch oxidativen Stress, der durch zahlreiche abiotische und biotische Faktoren ausgelöst werden kann, induziert (Bindschedler *et al.*, 2008).

Die Interaktion von *P. indica* mit *Arabidopsis* und den Mutanten *rop1*, *rop6* sowie *rop1rop6* führte zu einer verstärkten Expression des GLPs *At5g38910* (Abb. 3. 26 A und B) als Zeichen einer Abwehrreaktion, die unabhängig von den hier untersuchten ROPs ist. Diese Reaktion hält auch am 6. Tag an, dem Zeitpunkt, an dem der wachstumsfördernde Effekt von *P. indica* auf den Wildtyp, nicht aber auf die Doppelmutante *rop1rop6*, nachweisbar ist. Daraus lässt sich schließen, dass *At5g38910* an einer Begrenzung der Besiedelung durch den Pilz beteiligt sein könnte. Durch die Interaktion des Wildtyps mit dem Pilz wird die mRNA von *att1l*, *cbp60g* und von der Chitinase *At2g43570* am 2. Tag der Interaktion als Zeichen einer Abwehrreaktion gegen *P. indica* verstärkt exprimiert. Am 6. Tag werden diese Gene im Wildtyp weniger stark exprimiert als am 2. Tag. Die Transkription der Gene ist zu diesem Zeitpunkt in den *rop1*- und *rop6*-Mutanten höher als im Wildtyp. Die Doppelmutante zeigte eine wesentlich geringere Transkription als die *rop1*- und *rop6*-Mutanten (Abb. 3. 27 A und B). Die Regulation der Transkription dieser Gene als Antwort auf *P. indica* fällt offensichtlich durch das Fehlen von *rop1* und *rop6* geringer aus. Fehlen beide GTPasen fällt diese Reaktion noch stärker aus. Dies lässt eine direkte Beteiligung von ROP1 und ROP6 an der Erkennung des Pilzes und eine funktionelle Redundanz von mehreren ROPs oder die Beteiligung ROP-unabhängiger Signalwege vermuten, da es auch in den Mutanten zu einer erhöhten Transkription kommt, die allerdings schwächer als im Wildtyp ausfällt und verzögert eintritt. Zu den *early auxin-responsive*-Genen gehören Glutathion-S-Transferasen, welche in die Entgiftung von Fremdstoffen involviert sind (Teale *et al.*, 2006). Die Glutathion-S-Transferase *gstf6* wird z. B. durch Salizylsäure, H₂O₂ (Wagner *et al.*, 2002), *Pseudomonas syringae* und Ethylen innerhalb weniger Stunden in Blättern von *Arabidopsis* stark hochreguliert (Lieberherr *et al.*, 2003). *P. indica* bildet selbst geringe Mengen Auxin (Vadassery *et al.*, 2008; Sirrenberg *et al.*, 2007). Die mRNA der Glutathion S-Transferase *gstf6* wurde durch den Pilz im Wildtyp und in den Mutanten verstärkt reguliert, die Regulation ist offenbar unabhängig von ROP1 und ROP6 (Abb. 3. 27 A und B). Die mRNA von *gstf3* wurde im Wildtyp und in den Mutanten differentiell hochreguliert (Abb. 3. 28 A und B). Die Regulation weist auf eine verzögerte Abwehrreaktion gegen den Pilz in den Mutanten und einen direkten Einfluss von ROP1 und ROP6 hin. Auxin führt zur Aktivierung von ROPs und vermittelt die Auxin-induzierte Genexpression durch den Abbau der Aux/IAA-Transkriptions-Repressorproteine. Der freie *Auxin Response Faktor* (ARF) kann dimerisieren und die Auxin-induzierte Genexpression stimulieren, die zwischengeschalteten Signalkomponenten sind allerdings unbekannt (Tao *et al.*, 2002; 2005). Durch die *knock-out*-Mutationen von *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* könnte die Auxin-induzierte Genexpression beeinträchtigt sein und die veränderte Genexpression von *gstf3* in den Mutanten begründen. Die verzögerte Genexpression könnte ein Hinweis auf funktionelle Redundanz weiterer ROPs sein.

Die *knock-out*-Mutationen von *rop1* und *rop6* führten zu einer unterschiedlichen Regulation von *profilin4*. Profilin ist für die Dynamik des Aktinzytoskeletts essentiell, es kann

monomeres G-Aktin binden und dadurch die Aktinpolymerisation fördern oder verhindern, in Abhängigkeit von den vorhandenen G-Aktin- und Profilin-Konzentrationen. Profilin kann mit anderen Aktin-bindenden Proteinen, wie ADF (*actin depolymerizing factor*) oder Formin-homologen Proteinen interagieren (Hussey *et al.*, 2006). Zusätzlich kann Profilin mit Membran-Phosphoinositiden interagieren und die Bindung von Phosphatidylinosit 4,5-bisphosphat weist auf eine Beteiligung von Profilin in der Signaltransduktion hin (Drøbak, *et al.*, 2004). Die mRNA von *profilin4* wird am 2. Tag der Interaktion durch den Pilz im Wildtyp leicht hochreguliert, in den Mutanten kommt es dagegen zu einer Abnahme des Transkriptlevels (Abb. 3. 28 A). Am 6. Tag der Interaktion zeigte *profilin4* im Wildtyp eine weitere Zunahme der Transkriptmenge, hervorgerufen durch den Pilz. Die Zunahme der mRNA von *profilin4* blieb in den *rop6*-Mutanten gering (Abb. 3. 28 B). In der Doppelmutante kam es zu keiner Regulation des Gens. Die Regulation von *profilin4* im Wildtyp lässt vermuten, dass es bereits am 2. Kultivierungstag zu Veränderungen der Dynamik des Aktinzytoskeletts kommt, die am 6. Tag noch zugenommen haben, möglicherweise durch den nun direkten Kontakt des Pilzes zur Wurzel. Die *knock-out*-Mutation von *rop1* und *rop6* scheint die geringe bzw. ausbleibende Regulation der *profilin4*-Transkription hervorzurufen. Dies wirkt sich vermutlich auf den durch *P. indica* hervorgerufenen Umbau des Aktinzytoskelett (Abb. 3. 24 und Abb. 3. 25) aus und könnte eine Ursache für die beobachtete Wachstumshemmung sein (Abb. 3. 18 A). Ob ROPs grundsätzlich einen Einfluss auf das Transkriptlevel von *profilin4* haben, wurde bisher nicht nachgewiesen. Die hier durchgeführten *microarrays* lassen dies jedoch nicht vermuten, da die Signalintensitäten von *profilin4* im Wildtyp und in der Doppelmutante ohne *P. indica* nahezu identisch waren. Offenbar ist ein Stimulus nötig, der zur Aktivierung von ROP1 und/oder ROP6 führt, um die Transkription von *profilin4* zu beeinflussen. Ein gemeinsames räumliches Vorkommen von Profilinen mit ROP-Proteinen konnte in der pathogenen Interaktion zwischen *Petroselinum crispum*-Zellen und dem Oomyzeten *Phytophthora infestans* nachgewiesen werden. Während der Infektion kommt es zu einer Umlagerung der Aktinfilamente in Richtung des Appressoriums und am Penetrationsort wurde eine starke Profilin- und ROP-Akkumulation beobachtet (Schütz *et al.*, 2006).

Die *real-time*-Experimente konnten den auf Grund der *microarrays* vorhandenen Verdacht einer durch den Pilz ausgelösten Regulation von *rop1*, *rop2*, *rop3*, *rop6*, *rop11*, *ric2* und *ric4* nicht bestätigen (Abb. 3. 29, 3. 30 A und B). Das bedeutet nicht, dass diese Gene keine Funktion für die durch den Pilz verursachte Signaltransduktion haben. Für *rop1* und *rop6* konnte eine Beeinflussung der Genexpression nachgewiesen werden. Die Aktivität der Proteine setzt nicht unbedingt eine vermehrte Transkription voraus, sondern kann auch durch die ROP-interagierenden Proteine RopGEF, RopGDI und RopGAP erfolgen (s. 1. 5). Diese Aussage trifft auch für die Transkription von *rop2* zu, die in der Doppelmutante keine Zunahme des mRNA-Levels gegenüber dem Wildtyp unabhängig vom Pilz zeigte (Abb. 3. 31 A und B).

4.6 *P. indica* verursacht eine verstärkte Bildung von Aktinbündeln im *Arabidopsis*-Wildtyp jedoch nicht in den *rop1*-, *rop6*- und *rop1rop6*-knock-out- Mutanten

Das Aktinzytoskelett spielt in zahlreichen physiologischen Prozessen wie der Zellteilung, Zellstreckung, im Organellen- und Vesikelverkehr, bei der Endo- und Exozytose und in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Für verschiedene pathogene Interaktionen wurde die Rolle des Aktinzytoskeletts untersucht. So geht die Akkumulation von Abwehrstoffen und Kallose mit der Umordnung der Aktinfilamente am Ort des Pathogenkontakts einher. Auch die Wanderung des Zellkerns an den Penetrationsort des Pathogens und die Akkumulation von Phenolen und H₂O₂ ist abhängig von der Dynamik des Aktinzytoskelett (Groß *et al.*, 1993; Mellersh *et al.*, 2002).

Durch den Angriff von *B. graminis* auf resistente Gerste kommt es zur Polarisation von Aktinfilamenten in Richtung des Penetrationsortes. Die Ausrichtung von Aktinfilamenten zum Penetrationsort geht offenbar mit einer erfolgreichen Pathogenabwehr einher (Takemoto *et al.*, 2003; Schmelzer, 2002; Opalski *et al.*, 2005). Für die symbiotische Beziehung zwischen *Lotus japonicus* und *Mesorhizobium loti* ist die Dynamik des Aktinzytoskeletts ebenfalls von Bedeutung, wie anhand von *nap1*- und *pir1*-Mutanten gezeigt werden konnte. Pir1 und NAP1 sind Untereinheiten des SCAR/WAVE-Komplexes und für die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts mitverantwortlich, die durch das Nod-Faktor produzierende Bakterium *M. loti* ausgelöst werden (Yokota *et al.*, 2009).

Durch die Visualisierung des F-Aktins mit dem GFP-FABD2-Konstrukt (s. 2. 2. 8. 1 und 3. 5) (Voigt *et al.*, 2005) wurde der Einfluss von *P. indica* auf die Regulation des Aktinzytoskeletts von *Arabidopsis* und der *knock-out*-Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* für den 2. und 6. Tag der Interaktion untersucht (Abb. 3. 24 und 3. 25). Zwischen Mutanten und Wildtyp treten deutliche strukturelle Unterschiede im Aktinzytoskelett auf. In den Mutanten *rop1* und *rop6* ist die Bildung von Aktinbündeln in den Wurzelzellen nachweisbar, wenn auch in geringerem Maße als im *Arabidopsis*-Wildtyp (Abb. 3. 25 D und E). Durch den direkten und indirekten Kontakt mit dem Pilz kommt es aber nur im Wildtyp, vor allem im Leitgewebe, zu einer Zunahme von längsgerichteten Aktinsträngen - ein Hinweis auf einen intensiven Stofftransport (Thomas *et al.*, 2009). In der Rhizodermis sind ebenfalls Aktinbündel nachweisbar. In den *rop1*- und *rop6*-Mutanten waren in den Kontrollen und in infizierten Wurzeln weitaus weniger Aktinbündel (Abb. 3. 25 D und E) und Aktinstränge in der Rhizodermis und im Leitgewebe nachweisbar. Einige Wurzeln wiesen auch bei direktem Kontakt mit dem Pilz keine Aktinbündel auf (Abb. 3. 25 F). Zu diesem Zeitpunkt der Interaktion sind Chlamydosporen äußerst selten zu beobachten und das Hyphensystem des Pilzes umgibt die Wurzel von außen. Ein einzelner Kontaktpunkt, der z. B. bei der Sporenkeimung und Appressorienbildung von *B. graminis* auf Gerste beobachtet werden kann, tritt in der Beziehung zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* vermutlich sehr selten auf. In den *rop1rop6*-Mutanten findet man auch bei direktem Kontakt mit dem Pilz keine Aktinbündel. Die Mutante *rop1rop6* bildete weder in den Wurzelzellen noch in den

Wurzelhaaren Aktinbündel oder Aktinstränge aus (Abb. 3. 24 E-H, Abb. 3. 25 G und H). Kortikales, d. h. membranständiges F-Aktin, war in der Mutante *rop1rop6* in weitaus größerem Maße als im Wildtyp und in den Mutanten *rop1* und *rop6* nachweisbar. In wachsenden Pflanzenzellen findet sich vor allem das fein-verzweigte, dynamische F-Aktin. Es vermittelt wahrscheinlich die Akkumulation von Vesikeln mit Zellmaterial und fördert das Wachstum. In ausgewachsenen Zellen findet man hingegen eine ausgedehnte Bildung von Aktinbündeln (Thomas *et al.*, 2009). Da alle Aufnahmen die Wurzelhaarzone betreffen, sollten die Zellen ihr Streckungswachstum beendet haben und wie die Wildtypzellen Aktinfilamentbündel aufweisen. Da sich die Position der Wurzelhaare in der Doppelmutante *rop1rop6* nicht verändert, kann ausgeschlossen werden, dass sich die Zellen weiter im Streckungswachstum befinden. Vermutlich ist die Ursache der ausbleibenden Aktinbündel- und Aktinkabelbildung auf ROPs zurückzuführen, die an der Regulation verschiedener Protein- und Proteinkomplexe teilnehmen, welche Einfluss auf das Aktinzytoskelett haben.

So aktivieren ROPs den WAVE-Komplex, wodurch der ARP2/3-Komplex (s. 1. 8. 3) aktiviert wird, der die Polymerisation von monomeren G-Aktin an bereits existierende Aktinfilamente induziert (Berken und Hülskamp, 2006). Mutationen, die den SCAR/WAVE- oder den ARP2/3-Komplex betreffen, beeinflussen die Organisation des Aktinzytoskeletts und die Morphologie von Trichomen, es kommt zur Auflösung von Aktinbündeln und zur Reduktion von Aktinfilamenten in Abhängigkeit vom Stadium des Trichomwachstums (Basu *et al.*, 2004; 2005). Welche ROPs die Aktivierung des ARP2/3-Komplexes auslösen ist noch unklar (Basu *et al.*, 2008). ROP-Proteine regulieren außerdem die Polymerisation des F-Aktins durch die Interaktion mit RIC4 und die Ca^{2+} -abhängige Depolymerisation des F-Aktins durch die Interaktion mit RIC3. Die Überexpression von RIC4 in Pollenschläuchen führt zur Bildung eines stabilen F-Aktinnetzwerks, über eine verstärkte Bildung von Aktinbündeln wurde jedoch keine Aussage getroffen (Gu *et al.*, 2005). ROPs regulieren möglicherweise auch Phosphoinositide. Phosphoinositide vermitteln Veränderungen des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels, wodurch sie ebenfalls die Aktivität von verschiedenen Aktinbindenden Proteinen, z. B. ADFs und von Aktin-bündelnden Proteinen beeinflussen können (Lee und Yang, 2008; Nibau *et al.*, 2006). Zu den Aktin-bündelnden Proteinen, die Ca^{2+} -abhängige Funktionen haben, gehören einige Villin-iso-formen wie z. B. ABP29, das in wachsenden Pollenschläuchen nachgewiesen wurde. Eine Aktivierung durch ROPs wurde bisher nicht festgestellt (Lee und Yang, 2008).

ROPs regulieren die Aktivität von ADFs wahrscheinlich durch die Vermittlung von Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Die Überexpression von NtRac1, einem AtROP-homologen Protein von Tabak, vermindert die Bindung von NtADF1 an Aktin und Aktinkabel bzw. -bündel werden nicht aufgelöst. Das aktivierte NtRac1 ist vermutlich an der Phosphorylierung von NtADF1 an der *Ser-6* Position beteiligt, wodurch dieses Protein inaktiviert wird (Chen *et al.*, 2003). In Vertebraten wurde die verantwortliche Kinase, die diese Phosphorylierung durchführt, bereits 1998 von Neng Yang und seinen Mitarbeitern

gefunden. Es handelt sich dabei um eine LIM-Kinase, die durch RACs, eine Untergruppe der RHO-Familie der Vertebraten, aktiviert wird.

In *Arabidopsis* führt die Überexpression von ADF1 zum Verschwinden dicker Aktinkabel und zur Abnahme der Wurzelhaarlänge. Wird die Expression von AtADF1 hingegen reduziert, kommt es zur verstärkten Bildung von Aktinkabeln wodurch eine Zunahme der Wurzelhaarlänge verursacht wird (Dong *et al.*, 2001). Eine deutliche Zunahme der Wurzelhaarlänge konnte für die *rop6*-Überexpressionsmutante (Abb. 3. 14 B) beobachtet werden. Eine Abnahme der Wurzelhaarlänge wurde für die Doppelmutante *rop1rop6* nachgewiesen (Abb. 3. 14 B). Lemichez *et al.* hat 2001 nachgewiesen, dass die Überexpression bzw. verminderte Expression von *rop6* in Schließzellen von *Arabidopsis* zu einer verstärkten Bildung bzw. zum Auflösen von Aktinbündeln und Aktinkabeln führt. Die Überexpression von ROP1 in Pollenschläuchen führt ebenfalls zu einer vermehrten Bildung von Aktinkabeln und beeinflusst deren Wachstum (Fu *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2005). Die hier untersuchten *rop*-FABD2-Mutanten zeigen, dass ROP1 und ROP6 in die Bildung von Aktinkabeln und Aktinbündeln in Wurzeln involviert sind. Nimmt man an, dass ROP1 und ROP6 für die Inaktivierung von AtADF1 durch Phosphorylierung verantwortlich sind, würden in *knock-out*-Mutanten auf Grund der übermäßigen Aktivität von AtADF1 wenige oder keine Aktinkabel zu finden sein, so wie es bei den hier untersuchten *rop1*-, *rop6*- und *rop1rop6*-*knock-out*-Mutanten der Fall war. Möglicherweise sind ROP1 und ROP6 auch an der Aktivierung aktinbindender Proteine wie Fimbrin, Villin, Formin oder LIM-Proteinen beteiligt (s. 1. 8. 1 und 1. 8. 2). In Pollenschläuchen von Tabak wurde nachgewiesen, dass das Formin AtFH3 an der Ausbildung von Aktinkabeln und damit für die Zytoplasmaströmung und das polare Wachstum mit verantwortlich ist (Ye *et al.*, 2009). In *Drosophila diaphanous*, Säugern und *S. cerevisiae* wurden Formine als Effektoren von RHO-Proteinen identifiziert (Takai *et al.*, 2001). In Pflanzen konnte eine Interaktion mit ROPs noch nicht nachgewiesen werden. Die untersuchten ROPs müssten wahrscheinlich mit verschiedenen Aktin-bündelnden Proteinen interagieren, um den in der *rop1rop6*-Mutante beobachteten Aktin-Phänotyp auszulösen, denn die bisherige Untersuchung von *knock-out*-Mutanten von nur einem Aktin-bündelnden Protein hatte keinen Aktin-Phänotyp zur Folge (Thomas *et al.*, 2009). Es ist wahrscheinlicher, dass ROP1 und ROP6 an der Regulation von ADFs und/oder des ARP2/3-Komplexes beteiligt sind und die Bildung von Aktinfilamenten in einer Weise beeinflussen, die dazu führt, dass die Voraussetzungen zur Bildung von Aktinbündeln und -kabeln beeinträchtigt sind. ROP2 konnte eine Beteiligung an der Regulation des feinen F-Aktins an der Wurzelhaarspitze zugeordnet werden (Jones *et al.*, 2002), so dass die Hypothese aufgestellt werden kann, dass verschiedene ROPs in die Regulation der Dynamik des Aktinzytoskeletts involviert sind und diese mit unterschiedlichen Proteinen wechselwirken und sich so die *knock-out*-Mutation von zwei ROPs stärker auf den Aktin-Phänotyp auswirkt. Trotz der starken Veränderungen des Aktinzytoskeletts in der Doppelmutante fiel auf, dass die Pflanzen im Wachstum nicht beeinträchtigt waren. Ein Grund dafür könnte sein, dass auch

der vollständige Verlust des F-Aktins oder die Mutation mehrerer Untereinheiten des ARP2/3-Komplexes in Pflanzen weit weniger dramatische Auswirkungen hat als in tierischen Zellen oder Hefe (Hussey *et al.*, 2006; Berken und Hülskamp, 2006). Auch ohne F-Aktin sind Pflanzenzellen zur Zellteilung, postembryonalen Entwicklung und Morphogenese fähig. Die Zellelongation ist allerdings stark F-Aktin-abhängig, so dass der Verlust des F-Aktins zu Zwergwuchs in *Arabidopsis* führt (Baluška *et al.*, 2001). Das F-Aktin ist in der Doppelmutante jedoch vorhanden und die fehlende Ausbildung von Aktinbündeln in der Doppelmutante ist weder für das Pflanzenwachstum (Abb. 3. 17 A-C und Abb. 3. 19) noch für die Aufnahme von *P. indica*-Sporen (Abb. 3. 23 B) essentiell.

ROP-GTPasen sind für die pathogene Interaktion zwischen Gerste und dem biotrophen Pilz *Blumeria graminis* von Bedeutung. So fördert z. B. das konstitutiv exprimierte ROP-Homolog HvRAC1 die Anfälligkeit gegen *B. graminis*, unterstützt jedoch während der Penetration die Resistenz gegen den hemibiotrophen Pilz *Magnaporthe oryzae* in Gerste (Pathuri *et al.*, 2008), so dass in Abhängigkeit von der Lebensweise eines Organismus eine veränderte Signaltransduktion zu unterschiedlichen Reaktionen führt. Einige RACs haben keinen Einfluss auf die Anfälligkeit. Der transiente *knock down* von RACB erhöht jedoch die Penetrationsresistenz gegen *B. graminis* (Schultheiss *et al.*, 2002). RACB beeinflusst die Umordnung von Aktinfilamenten während des Befalls von Gerste durch *B. graminis* (Opalski *et al.*, 2005). Das RACB-Protein der Gerste wird derselben phylogenetischen Untergruppe wie die Proteine ROP1 bis ROP6 von *Arabidopsis* zugeordnet (Schultheiss *et al.*, 2003).

4. 7 ROP1 und ROP6 sind nicht in den Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma involviert, der durch den Zellwandextrakt von *P. indica* ausgelöst wird

Pflanzen haben in der Rhizosphäre Kontakt zu einer Vielzahl von Mikroorganismen. Senden diese Mikroorganismen Botenstoffe aus, die an einen spezifischen Rezeptor der Pflanze binden, kommt es zur Aktivierung von Signalwegen. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einem vorübergehenden Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels und zu einer Aktivierung nachfolgender Signalwege (Navazio und Mariani, 2008). Calcium induziert in der Zelle als *second messenger* zahlreiche Signalwege, die durch abiotische und biotische Stimuli ausgelöst werden (Knight *et al.*, 1991; Kiegle *et al.*, 2000; Blume *et al.*, 2000). Für die spezifische Aktivierung von Signalwegen ist daher der Raum-zeitliche Verlauf des Ca^{2+} -Einstroms, die Signalstärke und der anschließende Abbau des erhöhten Ca^{2+} -Spiegels von Bedeutung. So kommt es z. B. in der Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien durch die Bindung des Nod-Faktors an den vermutlichen Rezeptor NFP zu einer typischen Ca^{2+} -Signatur, d. h. einem definierten Muster von Schwankungen des Ca^{2+} -Spiegels im Zellkern und im perinuklearen Zytoplasma der Wurzelhaare von *M. truncatula* (Oldroyd und Downie, 2006).

Durch die Behandlung mit einem aus *P. indica* isolierten Zellwandextrakt kommt es zu einem schnellen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels in *Arabidopsis*-Wurzeln. Die Reaktion auf

den Zellwandextrakt ist vermutlich Rezeptor-vermittelt und führt zu Protein-Phosphorylierungen, wahrscheinlich auf der Rezeptor-Ebene (Vadassery *et al.*, 2009a). ROPs können mit Rezeptoren in Verbindung stehen (Trotochaud *et al.*, 1999; Kaothien *et al.*, 2005) und befinden sich im aktivierten Zustand in der Plasmamembran (Sorek *et al.*, 2007), so dass sie auf Grund ihrer Lokalisation an der Bildung eines Ca^{2+} -Gradienten, ausgelöst durch den Zellwandextrakt, beteiligt sein könnten.

Ein Ca^{2+} -Gradient konnte auch in wachsenden Pollenschläuchen und Wurzelhaaren festgestellt werden (Li *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2005; Molendijk *et al.*, 2001). ROP1 reguliert vermutlich die Bildung eines Ca^{2+} -Gradienten an der Spitze des Pollenschlauches durch das Effektorprotein RIC3. RIC3 fördert vermutlich die Ca^{2+} -Akkumulation durch den lokalisierten Ca^{2+} -Influx durch Ca^{2+} -permeable Plasmamembrankanäle (Li *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2005). ROP1 reguliert wahrscheinlich auch die Lokalisation des Proteins CNGC18, das an post-Golgi-Vesikeln und an der Plasmamembran nachweisbar ist. CNGCs (*cyclic nucleotide-gated channels*) sind „nicht- selektive Kationenkanäle“, die u. a. für Calcium durchlässig sind. Durch die Aktivität von ROP1 ist das pollenspezifische Protein CNGC18 hauptsächlich an der Spitze des Pollenschlauches in der Plasmamembran nachweisbar und dort vermutlich für die Ca^{2+} -Leitfähigkeit verantwortlich, wobei die Ca^{2+} -Leitfähigkeit anscheinend nicht durch ROP1 reguliert wird (Chang *et al.*, 2007). ROPs könnten demzufolge indirekt in die Bildung von Ca^{2+} -Gradienten involviert sein, indem sie die Lokalisation von CNGCs regulieren.

Durch die Behandlung mit dem ZWE von *P. indica* konnte die differentielle Regulation verschiedener *cngc*-mRNAs nachgewiesen werden (Vadassery *et al.*, 2009a). Durch die Transformation von *Arabidopsis* mit dem Ca^{2+} -Sensorprotein Apoaequorin (Knight *et al.*, 1991) wurde untersucht, ob die *knock-out*-Mutationen von *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* zu Veränderungen der Ca^{2+} -Signatur führen und die daraus resultierende Aktivierung von Signalwegen von ROP1 und ROP6 beeinflusst wird. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass ROP1 und ROP6 keine Rolle für den Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma und für den anschließenden Abbau des Ca^{2+} -Gradienten in den Wurzelzellen von *Arabidopsis* spielen. Auch die *knock-out*-Mutation beider Gene hatte keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Signatur. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass eine funktionelle Redundanz von ROP1 und ROP6 Einfluss auf den Ca^{2+} -Gradienten hatte. Die veränderte Genexpression von *cpb60g* zeigte allerdings, dass ROP1 und ROP6 in *P. indica* induzierte Ca^{2+} -Signalwege involviert sind (Abb. 3. 27 A und B).

4.8 Modell für die Rolle von ROP1 und ROP6 in der Interaktion von *Arabidopsis* mit *P. indica*

Pflanzen erkennen pathogene und symbiotische Organismen, indem sie sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) durch extrazelluläre Rezeptor-ähnliche Kinasen (RLKs) wahrnehmen (Zhao und Qi, 2008). RopGEFs (*Guaninnucleotid exchange factors*) aktivieren ROPs, sie stellen wahrscheinlich die Verknüpfung von Rezeptorkinasen und ROP-GTPasen dar. So wurde in Tomate ein RopGEF-Homolog als Interaktionspartner der pollenspezifischen Rezeptorkinasen LePRK1 und LePRK2 identifiziert (Kaothien *et al.*, 2005). Ein weiterer Hinweis für eine Interaktion zwischen ROPs und Rezeptorkinasen wurde in *Arabidopsis* entdeckt. Dort wurden die Rezeptor-ähnlichen Kinasen CLAVATA1, CLAVATA3, eine Proteinphosphatase und ein ROP-Protein in einem gemeinsamen Signalkomplex gefunden (Trotochaud *et al.*, 1999). Als ROP-Interaktionspartner wurden auch die Rezeptorkinase NCRK und die zytosolischen Kinasen RBK1 und RBK2 identifiziert (Molendijk *et al.*, 2008).

Welche ROP-GTPasen in symbiotischen Beziehungen von Bedeutung sind, wurde bisher kaum untersucht. Die Informationen beschränken sich auf die differentielle Expression von ROPs in der Ektomykorrhiza von *Betula pendula* mit *Paxillus involutus* und den Wurzelknöllchen von *Medicago sativa* mit *Sinorhizobium meliloti* (Berken, 2006). ROPs spielen jedoch in zahlreichen Pathogen-assoziierten Signalwegen eine Rolle. So wurde z. B. OsRAC1 (in Reis und Gerste werden ROPs im Allgemeinen als RACs bezeichnet) als positiver Regulator der NADPH-Oxidase identifiziert. Durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt es zu einer vermehrten Bildung von ROS verbunden mit einer Zunahme der Resistenz (Kawasaki *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2001). Für die ROP-induzierte Bildung von ROS genügte nicht die konstitutive Expression oder Überexpression von ROP2. Ein zusätzlicher Stimulus, wie die exogene Zugabe von Phosphorsäure ist notwendig, um den Signalweg zu aktivieren (Park *et al.*, 2004). Ein aus *P. indica* isolierter ZWE führte in den Wurzeln von *Arabidopsis* nicht zu einer verstärkten Bildung von H₂O₂ (Vadassery *et al.*, 2009a), das auch während der Entwicklung in Wurzeln (Dunand *et al.*, 2007) und Wurzelhaaren (Jones *et al.*, 2007) gebildet wird. In den hier untersuchten *knock-out*- und Überexpressionsmutanten konnten ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der Bildung von H₂O₂ und extrazellulärem Superoxid durch die Kultivierung mit *P. indica* festgestellt werden. Auch scheint *P. indica* nicht wie *Epichloë festucae*, ein Symbiont von *Lolium perenne*, selbst nachweisbare ROS-Konzentrationen zu bilden, um sich in der Pflanze zu etablieren. In diesem Fall reguliert die pilzliche GTPase RacA die Bildung von ROS durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase NoxA von *Epichloë festucae* (Tanaka *et al.*, 2008).

Durch den Umbau der pflanzlichen Zellwandstruktur kann das Eindringen von Pathogenen verhindert werden. ROPs können diese Prozesse beeinflussen, so aktiviert OsRAC1 eine Cinnamoyl-CoA Reduktase, welche an der Lignin-Biosynthese beteiligt ist (Kawasaki *et al.*, 2006). OsRAC1 ist vermutlich auch an der Elicitor-induzierten Auslösung eines MAPK-

Signalweges beteiligt (Lieberherr *et al.*, 2005). MAPK-Signalwege sind in der Signaltransduktion biotischer und abiotischer Stressfaktoren von Bedeutung.

Auf Grund dieser und weiterer Informationen (s. 4. 6 und 4. 7) wurde das folgende Modell unter besonderer Berücksichtigung von ROP1 und ROP6 für die Erkennung von *P. indica* durch *Arabidopsis* erstellt. Die Abb. 4. 1 zeigt, dass ROPs in ihrer aktiven, d. h. GTP-gebundenen Form in *lipid rafts* vorhanden sind. ROPs weisen in *lipid rafts* neben einem Prenylierungsmotiv (schwarz) eine Acylierung auf (rot). Möglicherweise werden ROPs nur in *lipid rafts* aktiviert und stabilisieren sich selbst durch Acylierung wie Sorek und Mitarbeiter (2007) für ROP6 festgestellt haben.

Die Erkennung des pilzlichen Signals wird vermutlich durch extrazelluläre Rezeptor-ähnliche Kinasen (RLKs) vermittelt. Die Rezeptorkinase LRR1 wurde in *lipid rafts* nachgewiesen und die mRNA von LRR1 wurde durch die Interaktion mit dem Pilz hochreguliert (Shahollari *et al.*, 2005). Ein MATH-Domänen aufweisendes Protein, das sich wahrscheinlich ebenfalls in *lipid rafts* befindet, wird durch den Pilz verstärkt exprimiert und transient modifiziert, ob es eine Rolle bei der Erkennung des Pilzes spielt, ist bisher unklar (Pěskan-Berghöfer *et al.*, 2004; Oelmüller *et al.*, 2005). Das am Rezeptor eingehende Signal von *P. indica* führt zur Aktivierung von RopGEFs. Diese aktivieren ROPs, indem sie den Austausch von GDP mit GTP fördern. Der ZWE von *P. indica* löst einen Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma aus. ROP1 und ROP6 sind an diesem Ca^{2+} -Einstrom nicht beteiligt. ROPs sind vermutlich an der Elicitor-induzierten Auslösung von MAPK-Signalwegen beteiligt (Lieberherr *et al.*, 2005). MAPK-Signalwege werden auch durch den Zellwandextrakt des Pilzes aktiviert (Vadassery *et al.*, 2009a). Möglicherweise aktivieren ROP-GTPasen MAPKs und/oder regulieren die Genexpression MAPK-abhängiger und unabhängiger Signalwege. In den *rop-knock-out*-Mutanten konnte eine veränderte Regulation der Genexpression festgestellt werden.

Durch den Kontakt mit *P. indica* kommt es zu Veränderungen der Struktur des Aktinzytoskeletts im *Arabidopsis*-Wildtyp, an deren Regulation ROP1 und ROP6 beteiligt sind. Die Dynamik des Aktinzytoskeletts ist für die Ausbildung der symbiotischen Beziehung verbunden mit der Wachstumsförderung von *Arabidopsis* durch *P. indica* von großer Bedeutung, wie durch die Untersuchung der *rop*-Mutanten nachgewiesen werden konnte.

ROP-GTPasen aktivieren die NADPH-Oxidase, was zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt. Da aber eine verstärkte Bildung von ROS weder durch den ZWE (Vadassery *et al.*, 2009a) noch durch den Pilz in den *rop*-Mutanten nachgewiesen werden konnte, scheint dieser Signalweg bei der freundlichen Interaktion der beiden untersuchten Symbiosepartner keine Rolle zu spielen (Abb. 4. 1).

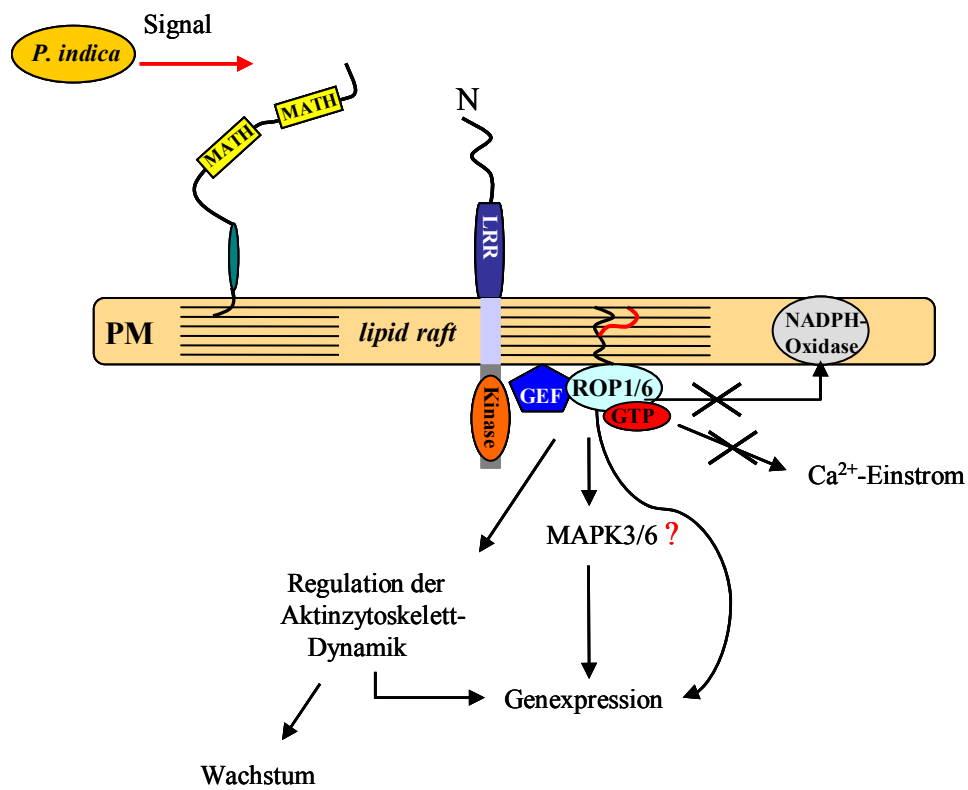


Abb. 4. 1: Modell der Signalwege, die durch ROPs in *Arabidopsis*-Wurzeln als Reaktion auf *P. indica* reguliert bzw. nicht reguliert werden. PM: Plasmamembran

5 Zusammenfassung

Die Interaktion des endophytisch lebenden Pilzes *Piriformospora indica* mit *Arabidopsis thaliana* führt zu einer Zunahme der Biomasse und der Samenproduktion von *Arabidopsis*. Über die Erkennung des pilzlichen Signals und die anschließende Signaltransduktion in *Arabidopsis* ist bisher wenig bekannt.

Die kleinen G-Proteine (*Guanine nucleotide-binding proteins*) der ROP-Familie (*RHO of plants*) kontrollieren eine Vielzahl von lebenswichtigen Signalwegen im Lebenszyklus einer Pflanze. Sie sind an Wachstumsprozessen, der Ausbildung der Zellpolarität, der Regulation des Aktinzytoskeletts, der Weiterleitung von Hormonsignalen sowie an pathogenen und nicht-pathogenen Interaktionen beteiligt.

Das Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob die kleinen GTP-bindenden Proteine ROP1 und ROP6 von *Arabidopsis* für die Erkennung und Ausbildung einer symbiotischen Beziehung mit *P. indica* von Bedeutung sind. Daher wurden homozygote *rop1*- und *rop6*-*knock-out*-Mutanten sowie *rop1*- und *rop6*-Überexpressionsmutanten erzeugt. Die erstmalige Erzeugung einer *rop*-Doppelmutante (*rop1rop6*) sollte Auskunft über redundante Funktionen von ROP1 und ROP6 geben. Die Herstellung einer homozygoten *ric4*-*knock-out*-Mutante (*ROP-interactive CRIB motif-containing protein*) sollte eine mögliche Beteiligung dieses ROP-interagierenden Proteins an der Interaktion mit *P. indica* nachweisen.

In den Wurzeln von *Arabidopsis* konnten alle 11 *rop*-mRNAs nachgewiesen werden, so dass *rop1* nicht länger als Blüten-spezifisches Gen betrachtet werden kann. Da ROP1 und ROP6 an der Regulation von Wachstumsprozessen und Hormonsignalwegen beteiligt sein können, wurden die Mutanten zunächst phänotypisch charakterisiert, insbesondere die Wurzel als das Pilz interagierende Organ. Die *knock-out*-Mutanten *rop1* und *rop1rop6*, aber auch die Überexpressionsmutanten zeigten eine deutliche Zunahme der Primärwurzellänge. Die Anzahl der Seitenwurzeln wies in den Mutanten keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf, so dass ROP1 und ROP6 nicht an der Auxin-regulierten Ausbildung von Seitenwurzeln beteiligt sind. Die Zunahme der Primärwurzellänge ist wahrscheinlich auf eine frühere Samenkeimung zurückzuführen. Sowohl die Inaktivierung von *rop1*, *rop6* oder von *ric4*, aber auch die Überexpression von *rop6* fördern die Samenkeimung. Vermutlich sind ROP1 und ROP6 neben weiteren bekannten ROPs an der Regulation der ABA-gesteuerten Dormanz beteiligt. Da *P. indica* häufig über die Wurzelhaare in die Pflanze eindringt und ROP-Proteine am Wurzelhaarwachstum beteiligt sind, wurde ihre Morphologie untersucht. Die Wurzelhaarlänge nimmt bei den *rop6*-Überexpressionsmutanten zu und bei der Doppelmutante ab. Die Überexpression von *rop1* und *rop6* aber auch die *knock-out*-Mutation von *rop1* verursachen die Ausbildung verzweigter Wurzelhaare. Dies zeigt, dass ROP1 und ROP6 am polaren Wachstum der Wurzelhaare beteiligt sind.

Im Anschluß an die phänotypische Charakterisierung der Mutanten wurden Kokultivierungsversuche mit *P. indica* durchgeführt, um den Einfluss der Mutationen auf die

Wachstumsförderung zu charakterisieren. Es konnte festgestellt werden, dass die Zunahme des Frischgewichts von Wurzel und Spross in allen Mutanten wesentlich geringer ausgeprägt war. In der Doppelmutante konnte sogar eine Hemmung des Spross- und Wurzelwachstums durch den Pilz beobachtet werden. Eine Ursache dafür könnte die größere Wurzelmasse der Mutanten insbesondere der Doppelmutante sein, was möglicherweise zur Auslösung einer anhaltenden Abwehrreaktion führt. Der Nachweis von *P. indica*-Sporen in den Wurzeln der Mutanten und des Wildtyps zeigte, dass das Maß der Besiedelung durch die Mutationen nicht verhindert oder stark gefördert wird. Die Besiedelung durch Sporen und die Wachstumsförderung sind offenbar voneinander unabhängig.

Die Analyse von *Arabidopsis*-microarrays lieferte Hinweise, dass die *P. indica* induzierte Expression von Genen in der Doppelmutante verzögert ist. Mit *real-time* PCR wurde nachgewiesen, dass Gene der Pathogenabwehr durch *P. indica* in den *knock-out*-Mutanten *rop1*, *rop6* und *rop1rop6* verändert reguliert werden.

Während der Infektion mit Pathogenen kommt es zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts. Mit Hilfe der erzeugten GFP-FABD2-*rop1*-, *rop6*- und *rop1rop6-knock-out*-Mutanten wurde die Struktur des Aktinzytoskeletts in Wurzeln während der Kultivierung mit *P. indica* untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass *P. indica* nur im Wildtyp eine verstärkte Bildung von Aktinbündeln und -strängen auslöst, was einen Hinweis auf einen intensiven Stofftransport darstellt, der in den Mutanten ausbleibt.

In den *rop1*- und *rop6-knock-out*-Mutanten kommt es zur Reduktion von Aktinbündeln und Aktinsträngen. In der Doppelmutante konnte das vollständige Verschwinden dieser Aktinstrukturen beobachtet werden. ROP1 und ROP6 sind demzufolge an der Regulation der Aktinzytoskelett-Dynamik beteiligt, vermutlich durch Inaktivierung oder Aktivierung von Aktin-bindenden Proteinen und Proteinkomplexen. Das völlige Verschwinden von Aktinbündeln und -strängen in der Doppelmutante weist auf redundante Funktionen von ROP1 und ROP6 hin.

Zahlreiche abiotische und biotische Stimuli verursachen einen Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma, wodurch die Aktivierung nachfolgender Signalwege ausgelöst wird. Ein Zellwandextrakt von *P. indica* verursacht in den Wurzeln von *Arabidopsis* einen Rezeptor-vermittelten transienten Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma. ROP-Proteine stehen zwar mit Rezeptorkinasen und der Regulation von Ca^{2+} -Gradienten in Verbindung, für den Ca^{2+} -Einstrom durch *P. indica* haben sie jedoch keine Bedeutung.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die kleinen GTP-bindenden Proteine ROP1 und ROP6 redundante Funktionen haben. Die Ausbildung einer symbiotischen Beziehung zwischen *Arabidopsis* und *P. indica* wird wesentlich von ROP1 und ROP6 beeinflusst, insbesondere durch die Regulation des Aktinzytoskeletts.

6 Summary

The endophytic mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* interacts with *Arabidopsis thaliana* and promotes plant growth and seed production. Less information is known about the fungal recognition signal in *Arabidopsis* and the subsequent signal transduction in the plant.

Small GTP-binding proteins of the ROP-family (RHO of plants) are involved in a variety of pivotal signaling processes, such as developmental processes, establishment of cell polarity, regulation of the actin cytoskeleton, transfer of hormone signals, and in pathogenic and non-pathogenic interactions. The aim of this work was to identify the role of the small *Arabidopsis*-GTPases ROP1 and ROP6 in recognition and formation of the symbiotic interaction with *P. indica*.

In a first step, homozygous *rop1* and *rop6* knock-out mutants and over-expressors were generated. For the first time a *rop*-double knock-out mutant (*rop1rop6*) could be created to check for redundant functions of the two GTPases. The homozygous knock-out mutant *ric4* (*ROP-interactive CRIB motif-containing protein*) was produced to determine the involvement of that ROP-interacting protein in the *P. indica* interaction.

In the roots of *Arabidopsis*, all known 11 *rop* genes were detectable, which implies that *rop1* is not specific for flower development. Given that ROP1 and ROP6 could be involved in the regulation of growth processes and hormone signaling pathways, mutants were phenotypically characterized, with special emphasis on roots as the fungus interacting organ. The knock-out mutants *rop1* and *rop1rop6* exhibited an increasing length of the primary roots. The number of lateral roots was not altered, therefore ROP1 and ROP6 might not be involved in auxin-induced development of lateral roots. The increase of the primary root length is probably a consequence of premature seed germination. The inactivation of *rop1*, *rop6* and *ric4* as well as the over-expression of *rop6* stimulated the germination of seeds. Presumably ROP1 and ROP6 are participating in addition to other ROPs in the regulation of ABA-controlled dormancy. Because *P. indica* often invade roots *via* root hairs and ROPs affect the development of the latter, the morphology of root hairs was checked. The *rop6* over-expressor displayed longer root hairs while the double mutant exhibited shorter root hairs. The over-expression of *rop1* and *rop6* as well as the knock-out of *rop1* resulted in an increased number of branched root hairs. This indicates, that ROP1 and ROP6 are involved in polar growth of root hairs.

Further, co-cultivation experiments with *P. indica* were performed to distinguish between the influence of the mutation and growth promotion. All mutants displayed a lower increase in root and shoot growth. In the double mutant even a growth inhibition could be observed. A reason for that effect might be the higher root weight, especially in the double mutant that exhibited a continuing defense reaction. Analysis of *P. indica* spores in the roots of wildtype and mutants demonstrated, that the extent of colonization is not inhibited or stimulated by the

mutations. Thus colonization with spores and growth promotion appear to be independent from each other.

The analysis of *Arabidopsis* microarrays provided indications for a delayed gene expression in the double mutant caused by *P. indica*. Real-time PCR experiments verified, that *Arabidopsis* defense genes were differentially regulated in *rop1*-, *rop6*- and *rop1rop6*-mutants under influence of *P. indica*.

During infection with pathogens there occurs a reorganization of the actin cytoskeleton. By means of GFP-FABD2-*rop1*-, *rop6*- and *rop1rop6*- knock out mutants, which were generated, the actin cytoskeleton in roots was analyzed when cultivated with *P. indica*. It could be demonstrated, that an enhanced formation of actin bundles und actin cables was present only in the wildtype. This points to an increased transport of substances, which fails in mutants.

In the knock-out mutants *rop1* and *rop6* a reduction of actin bundles and actin cables was observed. In the double mutant these actin structures were missing. Therefore, the results indicate that ROP1 and ROP6 are involved in the regulation of the actin cytoskeleton, presumably by activation and inactivation of actin-binding proteins and protein-complexes. The absence of actin bundles and actin cables in the double mutant is an indication for redundant functions of ROP1 and ROP6.

Numerous abiotic and biotic stimuli cause an influx of calcium ions in the cytosol followed by the activation of signaling pathways. A cell wall-extract of *P. indica* was shown to trigger a transient receptor-mediated calcium influx into the cytoplasm of *Arabidopsis* roots. ROP proteins are likely associated with such receptors and the regulation of calcium gradients, but for *P. indica* cell wall-extract induced calcium influx seems not necessary.

The presented results indicate, that the small GTPases ROP1 and ROP6 possess redundant functions and have a fundamental influence on the symbiotic interaction between *Arabidopsis* and *P. indica* especially by acting on the regulation of the actin cytoskeleton.

7 Literaturverzeichnis

- Allwood E. G., R. G. Anthony, A. P. Smertenko, S. Reichelt, B. K. Drøbak, J. H. Doonan, A. G. Weeds, P. J. Hussey (2002): Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor LIADF1. *The Plant Cell* 14: 2915-2927.
- Alonso J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadrinab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C. C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D. E. Carter, T. Marchand, E. Risseuw, D. Brogden, A. Zeko, W. L. Crosby, C. C. Berry, J. R. Ecker (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301 (5633): 653-657. Erratum in: *Science* (2003) 301 (5641): 1849.
- Anderson-Prouty A. J. und P. Albersheim (1975): Host-pathogen interactions. 8. Isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in pathogens host. *Plant Physiology* 56 (2): 286-291.
- Assmann S. M. (2002): Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *The Plant Cell* 14: 355-373.
- Babior B. M. (1999): NADPH oxidase: An update. *Blood* 93 (5): 1464-1476.
- Baltruschat H., J. Fodor, B. D. Harrach, E. Niemczyk, B. Barna, G. Gullner, A. Janeczko, K. H. Kogel, P. Schäfer, I. Schwarczinger, A. Zuccaro, A. Skoczowski (2008): Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist* 180 (2): 501-510.
- Baluška F., J. Salaj, J. Mathur, M. Braun, F. Jasper, J. Šamaj, N.-H. Chua, P. W. Barlow, D. Volkmann (2000): Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology* 227: 618-632.
- Baluška F., J. Jasik, H. G. Edelmann, T. Salajova, D. Volkmann (2001): Latrunculin B-induced plant dwarfism: plant cell elongation is F-actin-dependent. *Developmental Biology* 231: 113-124.
- Bao F., J. J. Shen, S. R. Brady, G. K. Muday, T. Asami, Z. B. Yang (2004): Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134 (4): 1624-1631.
- Barroco R. M., K. van Poucke, J. H. W. Bergervoet, L. de Veylder, S. P. C. Groot, D. Inze, G. Engler (2005): The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiology* 137 (1): 127-140.
- Basu D., S. E.-D. El-Assal, J. Le, E. L. Mallery, D. B. Szymanski (2004): Interchangeable functions of *Arabidopsis* PIROGI and the human WAVE complex subunit SRA1 during leaf epidermal development. *Development* 131 (17):4345-4355.

- Basu D., J. Le, S. E.-D. El-Essal, S. Huang, C. Zhang, E. L. Mallery, G. Koliantz, C. J. Staiger, D. B. Szymanski** (2005): DISTORTED/SCAR2 is a putative *Arabidopsis* WAVE complex subunit that activates the Arp2/3 complex and is required for epidermal morphogenesis. *The Plant Cell* 17: 502-524.
- Basu D., J. Le, T. Zakharova, E. L. Mallery, D. B. Szymanski** (2008): A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *PNAS* 105 (10): 4044-4049.
- Baxter-Burrell A., Z. Yang, P. S. Springer, J. Bailey-Serres** (2002): RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science* 296: 2026-2028.
- Belin C., C. Megies, E. Hauserova, L. Lopez-Molina** (2009): Absciscic acid represses growth of the *Arabidopsis* embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell* 21 (8): 2253-2268.
- Berken A., C. Thomas, A. Wittinghofer** (2005): A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* 436: 1176-1180.
- Berken A.** (2006): ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 246-2459.
- Berken A. und M. Hülkamp** (2006): Arp und wie er die Welt der Zellform in Pflanzen sah. *Biospektrum* 1: 30-32.
- Berken A. und A. Wittinghofer** (2008): Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 380-393.
- Bernier F. und A. Berna** (2001): Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly ? *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (7-8): 545-554.
- Bewley J. D.** (1997): Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9 (7): 1055-1066.
- Bibikova T. N., E. B. Blancaflor, S. Gilroy** (1999): Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 17 (6): 657-665.
- Bindschedler L. V., M. Palmblad, R. Cramer** (2008): Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry* 69 (10): 1962-1972.
- Birnboim H. C. und J. Doly** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Bischoff F., A. Molendijk, C. S. V. Rajendrakumar, K. Palme** (1999): GTP-binding proteins in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 233-256.
- Bischoff F., L. Vahlkamp, A. Molendijk, K. Palme** (2000): Localization of AtROP4 and AtROP6 and interaction with the guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGDI1 from *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 42(3): 515-530.
- Blume B., T. Nürnberger, N. Nass, D. Scheel** (2000): Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12 (8): 1425-1440.

- Brembu T., P. Winge, A. M. Bones, Z. Yang** (2006): A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases. *Cell Research* 16 (5): 435-445.
- Brodsky L. I., V. V. Ivanov, Y. L. Kalaidzidis, A. M. Leontovich, V. K. Nikolaev, S. I. Feranchuk, V. A. Drachev** (1995): GeneBee-NET: Internet-based server for analyzing biopolymers structure. *Biochemistry* 60 (8): 923-928.
- Brugnera E., L. Haney, C. Grimsley, M. Lu, S. F. Walk, A. C. Tosello-Trampont, I. G. Macara, H. Madhani, G. R. Fink, K. S. Ravichandran** (2002): Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the DOCK180-ELMO complex. *Nature Cell Biology* 4 (8): 574-582.
- Bullock W. O., J. M. Fernandez, J. M. Short** (1987): XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-379.
- Büthorn B., D. Rhody, P. Franken** (2000): Isolation and characterisation of Pitef1 encoding the translation elongation factor EF-1 alpha of the root endophyte *Piriformospora indica*. *Plant Biology* 2 (6): 687-692.
- Carlsson L., L. E. Nystrom, I. Sundkvist, F. Markey, U. Lindberg** (1977): Actin polymerizability is influenced by profilin, a low-molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of Molecular Biology* 115 (3): 465-483.
- Carol R. J., S. Takeda, P. Linstead, M. C. Durrant, H. Kakesova, P. Derbyshire, S. Drea, V. Zarsky, L. Dolan** (2005): A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* 438: 1013-1016.
- Carol R. J. und L. Dolan** (2006): The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *Journal of Experimental Biology* 57 (8): 1829-1834.
- Chassot C., C. Nawrath, J. P. Metraux** (2007): Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant Journal* 49 (6): 972-980.
- Cerione R. A. und Y. Zheng** (1996): The Dbl family of oncogenes. *Current Opinion in Cell Biology* 8: 216-222.
- Chang F., A. Yan, L. N. Zhao, W. H. Wu, Z. Yang** (2007): A putative Calcium-permeable cyclic nucleotide-gated channel, CNGC18, regulates polarized pollen tube growth. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (8): 1261-1270.
- Chaudhry F., C. Guérin, M. von Witsch, L. Blanchoin, C. J. Staiger** (2007): Identification of *Arabidopsis* cyclase-associated protein1 as the first nucleotide exchange factor for plant actin. *Molecular Biology of the Cell* 18: 3002-3014.
- Chen C. Y.-H., A. Y. Cheung, H.- M. Wu** (2003): Actin-depolymerizing factor mediates RAC/ROP GTPase-regulated pollen tube growth. *The Plant Cell* 15: 237-249.
- Cheung A. Y. und H.-M. Wu** (2004): Overexpression of an *Arabidopsis* formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *The Plant Cell* 16: 257-269.

- Cheung A.-Y., Q. -H. Duan, S. S. Costa, B. H. J. de Graaf, V. S. Di Stilio, J. Feijo, H.-M. Wu** (2008): The dynamic pollen tube cytoskeleton: live cell studies using actin-binding and micotubule-binding reporter proteins. *Molecular Plant* 1 (4): 686-702.
- Clough S. J. und A. F. Bent** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16 (6): 735-743.
- Corpet F.** (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16 (22): 10881-10890.
- Christensen A. B., H. Thordal-Christensen, G. Zimmermann, T. Gjetting, M. F. Lyngkjaer, R. Dudler, P. Schweizer** (2004): The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (1): 109-117.
- Deeks M. J., D. Kaloriti, B. Davies, R. Malhó, P. J. Hussey** (2004): *Arabidopsis* NAP1 is essential for Arp2/3-dependent trichome morphogenesis. *Current Biology* 14: 1410-1414.
- Deshmukh S., R. Hueckelhoven, P. Schäfer, J. Imani, M. Sharma, M. Weiss, F. Waller, K. H. Kogel** (2006): The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *PNAS* 103 (49): 18450-18457.
- Ding Y., P. Kalo, C. Yendrek, J. Sun, Y. Liang, J. F. Marsh, J. M. Harris** (2008): Absciscic acid coordinates Nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 20: 2681-2695.
- Dolan L., C. M. Duckett, C. Grierson, P. Linstead, K. Schneider, E. Lawson, C. Dean, S. Poethig, K. Roberts** (1994): Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120 (9): 2465-2474.
- Donaldson P. A., T. Anderson, B. G. Lane, A. L. Davidson, D. H. Simmonds** (2001): Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59 (6): 297-307.
- Dong C.-H., G.-X. Xia, Y. Hong, S. Ramachandran, B. Kost, N.-H. Chua** (2001): ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 1333-1346.
- Drøbak B. K., V. E. Franklin-Tong, C. J. Staiger** (2004): The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New Phytologist* 163: 13-30.
- Druege U., H. Baltruschat, P. Franken** (2007): *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. *Scientia Horticulturae* 112 (4): 422-426.
- Dunaevskii Y. E., T. A. Tsybina, G. A. Belyakova, V. I. Domash, T. P. Sharpio, S. A. Zabreiko, M. A. Belozerskii** (2005): Proteinase inhibitors as antistress proteins in higher plants. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41 (4): 344-348.

- Dunand C., M. Crevecoeur, C. Penel** (2007): Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist* 174 (2): 332-341.
- Favery B., L. A. Chelysheva, M. Lebris, F. Jammes, A. Marmagne, J. de Almeida-Engler, P. Lecomte, C. Vaury, R. A. Arkowitz, P. Abad** (2004): *Arabidopsis* formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *Plant Cell* 16 (9): 2529-2540.
- Felsenstein J.** (1989): PHYLIP - Phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Fischer U., Y. Ikeda, K. Ljung, O. Serralbo, M. Singh, R. Heidstra, K. Palme, B. Scheres, M. Grebe** (2006): Vectorial information for *Arabidopsis* planar polarity is mediated by combined AUX1, EIN2, and GNOM activity. *Current Biology* 16 (21): 2143-2149.
- Fleming A. J.** (2006): Plant signalling: the inexorable rise of auxin. *Trends in Cell Biology* 16 (8): 397-402.
- Foreman J., V. Demidchik, J. H. F. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M. A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J. D. G. Jones, J. M. Davies, L. Dolan** (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.
- Frey-Klett P., J. Garbaye, M. Tarkka** (2007): The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.
- Fu Y., G. Wu, Z. Yang** (2001): Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *Journal of Cell Biology* 152 (5): 1019-1032.
- Fu Y., Y. Gu, Z. Zheng, G. Wasteneys, Z. Yang** (2005): *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120: 687-700.
- Fu Y., T. Xu, L. Zhu, M. Wen, Z. Yang** (2009): A ROP GTPase signaling pathway controls cortical microtubule ordering and cell expansion in *Arabidopsis*. *Current Biology* 19: 1827-1832.
- Fukaki H. und M. Tasaka** (2009): Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology* 69 (4): 437-449.
- Galkin V. E., A. Orlova, O. Cherepanova, M.-C. Lebart, E. H. Egelman** (2008): High-resolution cryo-EM structure of the F-actin-fimbrin/plastin ABD2 complex. *PNAS* 105 (5): 1494-1498.
- Geldner N., J. Friml, Y.-D. Stierhof, G. Jürgens, K. Palme** (2001): Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-427.
- George S. P., Y. Wang, S. Mathew, K. Srinivasan, S. Khurana** (2007): Dimerization and actin-bundling properties of villin and its role in the assembly of epithelial cell brush borders. *Journal of Biological Chemistry* 282 (36): 26528.

- Grierson C. S., J. S. Parker, A. C. Kemp** (2001): *Arabidopsis* genes with roles in root hair development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164 (2): 131-140.
- Gross P., C. Julius, E. Schmeizer, K. Hahlbrockl** (1993): Translocation of cytoplasm and nucleus to fungal penetration sites is associated with depolymerization of microtubules and defence gene activation in infected, cultured parsley cells. *The EMBO Journal* 12 (5): 1735-1744.
- Gu Y., Z. Wang, Z. Yang** (2004): ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 527-536.
- Gu Y., Y. Fu, P. Dowd, S. Li, V. Vernaud, S. Gilroy, Z. Yang** (2005): A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *The Journal of Cell Biology* 169 (1): 127-138.
- Gu Y., S. Li, E. M. Lord, Z. Yang** (2006): Members of a novel class of *Arabidopsis* Rho guanine nucleotide exchange factors control Rho GTPase-dependent polar growth. *The Plant Cell* 18: 366-381.
- Gungabissoon R. A., S. Khan, P. J. Hussey, S. K. Maciver** (2001): Interaction of elongation factor 1 α from *Zea mays* (ZmEF-1 α) with F-actin and interplay with the maize actin severing protein, ZmADF3. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 49: 104-111.
- Hanahan D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557-580.
- Harrison M. J.** (2005): Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59: 19-42.
- Haubrick L. L. und S. M. Assmann** (2006): Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant Cell and Environment* 29 (3): 446-457.
- Hazak O., D. Bloch, L. Poraty, H. Sternberg, J. Zhang, J. Friml, S. Yalovsky** (2010): A Rho scaffold integrates the secretory system with feedback mechanisms in regulation of auxin distribution. *PLOS Biology* 8 (1), open access.
- Hoagland D. R. und D. I. Arnon** (1938): The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*. Circular 347.
- Huang S., R. C. Robinson, L. Y. Gao, T. Matsumoto, A. Brunet, L. Blanchoin, C. J. Staiger** (2005): *Arabidopsis* VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerisation. *Plant Cell* 17 (2): 486-501.
- Hussey P. J., T. Ketelaar, M. J. Deeks** (2006): Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review of Plant Biology* 57: 109-125.
- Jones J. D. G. und J. L. Dangl** (2006): The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Jones M. A., J.-J. Shen, Y. Fu, H. Li, Z. Yang, C. S. Grierson** (2002): The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell* 14: 763-776.

- Jones M. A., M. J. Raymond, Z. Yang, N. Smirnov** (2007): NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *Journal of Experimental Botany* 58 (6): 1261-1270.
- Kaldorf M., B. Koch, K.-H. Rexer, G. Kost, A. Varma** (2005): Patterns of interaction between *Populus* Esch5 and *Piriformospora indica*: a transition from mutualism to antagonism. *Plant Biology* 7 (2): 210-218.
- Kaothien P., S. H. Ok, B. Shuai, D. Wengier, R. Cotter, D. Kelley, S. Kiriakopolos, J. Muschietti, S. McCormick** (2005): Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. *The Plant Journal* 42: 492-503.
- Karimi M., D. Inze, A. Depicker** (2002): Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7 (5): 193-195.
- Kasprzewska A.** (2003): Plant chitinases - Regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8 (3): 809-824.
- Kawasaki T., K. Henmi, E. Ono, S. Hatakeyama, M. Iwano, H. Satoh, K. Shimamoto** (1999): The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *PNAS* 96 (19): 10922-10926.
- Kawasaki T., H. Koita, T. Nakatsubo, K. Hasegawa, K. Wakabayashi, H. Takahashi, K. Umemura, T. Umezawa, K. Shimamoto** (2006): Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *PNAS* 103: 230-235.
- Ketelaar T., C. Faivre-Moskalenko, J. J. Esseling, N. C. A. de Ruiter, C. S. Grierson, M. Dogterom, A. M. C. Emons** (2002): Positioning of nuclei in *Arabidopsis* root hairs: An actin-regulated process of tip growth. *The Plant Cell* 14 (11): 2941-2955.
- Ketelaar T., R. G. Anthony, P. J. Hussey** (2004): Green fluorescent protein-mTalin causes defects in actin organization and cell expansion in *Arabidopsis* and inhibits actin depolymerizing factor's actin depolymerizing activity *in vitro*. *Plant Physiology* 136 (4): 3990-3998.
- Kiegle E., C. A. Moore, J. Haseloff, M. A. Tester, M. R. Knight** (2000): Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant Journal* 23 (2): 267-278.
- Knecht K., M. Seyffarth, C. Desel, T. Thureau, I. Sherameti, B. Lou, R. Oelmüller, D. Cai** (2010): Expression of *BvGLP-1* encoding a germin-like protein from Sugar Beet in *Arabidopsis thaliana* leads to resistance against phytopathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23 (4): 446-457.
- Knight M. R., A. K. Campbell, S. M. Smith, A. J. Trewavas** (1991): Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352 (6335): 524-526.

- Kogel K. H., P. Franken, R. Hückelhoven** (2006): Endophyte or parasite-what decides ? *Current Opinion in Plant Biology* 9: 358-363.
- Kost B., E. Lemichez, P. Spielhofer, Y. Hong, K. Tolias, C. Carpenter, N. H. Chua** (1999): Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *The Journal of Cell Biology* 145 (2): 317-330.
- Kovar D. R., C. J. Staiger, E. A. Weaver, D. W. McCurdy** (2000): At-Fim1 is an actin filament crosslinking protein from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 24: 625-636
- Krysan P. J., J. C. Young, M. R. Sussman** (1999): T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11: 2283-2290.
- Landy A.** (1989): Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Annual review of Biochemistry* 58: 913-949.
- Lavy M., D. Bloch, O. Hazak, I. Gutman, L. Poraty, N. Sorek, H. Sternberg, S. Yalovsky** (2007): A novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance and vesicle trafficking. *Current Biology* 17: 947-952.
- Lee Y. J., A. Szumlanski, E. Nielsen, Z. Yang** (2008): Rho-GTPase dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth. *The Journal of Cell Biology* 181 (7): 1155-1168.
- Lee Y. J. und Z. Yang** (2008): Tip growth: signaling in the apical dome. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 662-671.
- Lemichez E., Y. Wu, J.-P. Sanchez, A. Mettouchi, J. Mathur, N.-H. Chua** (2001): Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes & Development* 15: 1808-1816.
- Li H., Y. Lin, R. M. Health, M. X. Zhu, Z. Yang** (1999): Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that lead to tip-localized calcium influx. *The Plant Cell* 11 (9): 1731-1742.
- Li H., G. Wu, D. Ware, K. R. Davis, Z. Yang** (1998): *Arabidopsis* Rho-related GTPases: Differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast. *Plant Physiology* 118: 407-417.
- Li H., J.-J. Shen, Z.-L. Zheng, Y. Lin, Z. Yang** (2001): The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 670-684.
- Li L., J. Xu, Z.-H. Xu, H.-W. Xue** (2005): Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* und *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 2738-2753.
- Lieberherr D., N. P. Thao, A. Nakashima, K. Umemura, T. Kawasaki, K. Shimamoto** (2005): A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-Protein in rice. *Plant Physiology* 138: 1644-1652.

- Lieberherr D., U. Wagner, P. H. Dubuis, J. P. Metraux, F. Mauch** (2003): The rapid induction of glutathione S-transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by avirulent *Pseudomonas syringae* is the result of combined salicylic acid and ethylene signalling. *Plant and Cell Physiology* 44 (7): 750-757.
- Lipshutz R. J., S. P. Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart** (1999): High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics* 21: 20-24.
- Markmann K. und M. Parniske** (2009): Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? *Trends in Plant Science* 14 (2): 77-86.
- Masubelele N. H., W. Dewitte, M. Menges, S. Maughan, C. Collins, R. Huntley, J. Nieuwland, S. Scofield, J. A. H. Murray** (2005): D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *PNAS* 102 (43): 15694-15699.
- Masucci J. D. und J. W. Schiefelbein** (1994): The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiology* 106 (4): 1335-1346.
- Mathur J. und M. Hülskamp** (2002): Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants. *Current Biology* 12: 669-676.
- McCurdy D. W. und M. Kim** (1998): Molecular cloning of a novel fimbrin-like cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 36: 23-31.
- Mellersh D. G., I. V. Foulds, V. J. Higgins, M. C. Heath** (2002): H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *The Plant Journal* 29 (3): 257-268.
- Minic Z., E. Jamet, L. Negroni, P. A. der Garabedian, M. Zivy, L. Jouanin** (2007): A sub-proteome of *Arabidopsis thaliana* mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. *Journal of Experimental Botany* 58 (10): 2503-2512.
- Molendijk A. J., F. Bischoff, C. S. V. Rajendrakumar, J. Friml, M. Braun, S. Gilroy, K. Palme** (2001): *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO Journal* 20 (11): 2779-2788.
- Molendijk A., B. Ruperti, K. Palme** (2004): Small GTPases in vesicle trafficking. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 694-700.
- Molendijk A. J., B. Ruperti, M. K. Singh, A. Dovzhenko, F. A. Ditengou, M. Milia, L. Westphal, S. Rosahl, T.-R. Soellick, J. Uhrig, L. Weingarten, M. Huber, K. Palme** (2008): A cysteine-rich receptor-like kinase NCRK and a pathogen-induced protein kinase RBK1 are Rop GTPase interactors. *The Plant Journal* 53: 909-923.
- Murashige T. und F. Skoog** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473-497.
- Navazio L. und P. Mariani** (2008): Calcium opens the dialogue between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Signaling & Behavior* 3 (4): 229-230.
- Nibau C., H.-M. Wu, A. Y. Cheung** (2006): RAC/ROP GTPases: 'hubs' for signal integration and diversification in plants. *TRENDS in Plant Science* 11 (6): 309-315.

- Oelmüller R., T. Pěskan-Berghöfer, B. Shahollari, A. Trebicka, I. Sherameti, A. Varma** (2005): MATH domain proteins represent a novel protein family in *Arabidopsis thaliana*, and at least one member is modified in roots during the course of a plant-microbe interaction. *Physiologia Plantarum* 124 (2): 152-166.
- Oelmüller R., I. Sherameti, S. Tripathi, A. Varma** (2009): *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis* 19 (1): 1-17.
- Oldroyd G. E. D. und J. A. Downie** (2006): Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 351-357.
- Ono E., H. L. Wong, T. Kawasaki, M. Hasegawa, O. Kodama, K. Shimamoto** (2001): Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *PNAS* 98 (2): 759-764.
- Opalski K. S., H. Schultheiss, K. H. Kogel, R. Hückelhoven** (2005): The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganisation in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *The Plant Journal* 41: 291-303.
- Ovecka M., M. Nadubinska, D. Volkmann, F. Baluška** (2000): Actomyosin and exocytosis inhibitors alter root hair morphology in *Poa annua*. *Biologia* 55 (1): 105-114.
- Park J., Y. Gu, Y. Lee, Z. Yang, Y. Lee** (2004): Phosphatidic acid induces leaf cell death in *Arabidopsis* by activating the Rho-related Small G Protein GTPase-mediated pathway of reactive oxygen species generation. *Plant Physiology* 134: 129-136.
- Park H.-O. und E. Bi** (2007): Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (1): 48-96.
- Parker J. S., A. C. Cavell, L. Dolan, K. Roberts, C. S. Grierson** (2000): Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12 (10): 1961-1974.
- Pathuri I. P., N. Zellerhoff, U. Schaffrath, G. Hensel, J. Kumlehn, K.-H. Kogel, R. Eichmann, R. Hückelhoven** (2008): Constitutively activated barley ROPs modulate epidermal cell size, defense reactions and interactions with fungal leaf pathogens. *Plant Cell Reports* 27: 1877-1887.
- Pěskan-Berghöfer T., B. Shahollari, P. H. Giong, S. Hehl, C. Markert, V. Blanke, G. Kost, A. Varma, R. Oelmüller** (2004): Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum* 122 (4): 465-477.
- Pfaffl M. W.** (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9): 2002-2007 (e45).
- Pirozynski K. A. und D. W. Malloch** (1975): The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153-164.
- Qui J.-L., R. Jilk, M. D. Marks, D. B. Szymanski** (2002): The *Arabidopsis* SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development. *The Plant Cell* 14: 101-118.

- Rahman A., A. Bannigan, W. Sulaman, P. Pechter, E. B. Blancaflor, T. I. Baskin** (2007): Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *The Plant Journal* 50: 514-528.
- Ranf S., P. Wünnenberg, J. Lee, D. Becker, M. Dunkel, R. Hedrich, D. Scheel, P. Dietrich** (2008): Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca^{2+} signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant Journal* 53 (2): 287-299.
- Reddy V. S., G. S. Ali, A. S. N. Reddy** (2002): Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome. *Journal of Biological Chemistry* 277 (12): 9840-9852.
- Rentel M. C. und Knight M. R.** (2004): Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135(3): 1471-1479.
- Ruijter N. C. A. und A. M. C. Emons** (1999): Actin-binding proteins in plant cells. *Plant Biology* 1: 26-35.
- Rutherford S. und I. Moore** (2002): The *Arabidopsis* Rab GTPase family: another enigma variation. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 518-528.
- Ryan E., C. S. Grierson, A. Cavell, M. Steer, L. Dolan** (1998): IP1 is required for both tip growth and non-tip growth in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 138 (1): 49-58.
- Sagi M., R. Fluhr** (2001): Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* 126: 1281-1290.
- Saiki R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-491.
- Samaj J., J. Müller, M. Beck, N. Böhm, D. Menzel** (2006): Vesicular trafficking, cytoskeleton and signaling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science* 11 (12): 594-600.
- Sambrook J. und D.W. Russell** (2001): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanders D., J. Pelloux, C. Brownlee, J. F. Harper** (2002): Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell* 14: 401-417.
- Sanger F., S. Nicklen, A. R. Coulson** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74 (12): 5463-5467.
- Schäfer P., S. Pfiffi, L. M. Voll, D. Zajic, P. M. Chandler, F. Waller, U. Scholz, J. Pons-Kühnemann, S. Sonnewald, U. Sonnewald, K. H. Kogel** (2009): Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant Journal* 59 (3): 461-474.
- Schmelzer E.** (2002): Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends in Plant Science* 7 (9): 411-415.

- Schultheiss H., C. Dechert, K.-H. Kogel, R. Hückelhoven** (2002): A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiology* 128: 1447-1454.
- Schultheiss H., C. Dechert, K.-H. Kogel, R. Hückelhoven** (2003): Functional analysis of barley RAC/ROP G- protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. *The Plant Journal* 36: 589-601.
- Schütz I., S. Gus-Mayer, E. Schmelzer** (2006): Profilin and Rop GTPases are localized at infection sites of plant cells. *Protoplasma* 227: 229-235.
- Selosse M.-A., S. Setaro, F. Glatard, F. Richard, C. Urcelay, M. Weiß** (2007): Sebaciniales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174: 864-878
- Sels J., J. Mathys, B. M. A. de Coninck, B. P. A. Cammue, M. F. C. de Bolle** (2008): Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (11): 941-950.
- Shahollari B., A. Varma, R. Oelmüller** (2005): Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *Journal of Plant Physiology* 162 (8): 945-958.
- Shahollari B., J. Vadassery, A. Varma, R. Oelmüller** (2007): A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 50 (1): 1-13.
- Sharma M., M. Schmid, M. Rothballer, G. Hause, A. Zuccaro, J. Imani, P. Kampfer, E. Domann, P. Schäfer, A. Hartmann, K. H. Kogel** (2008): Detection and identification of bacteria intimately associated with fungi of the order Sebaciniales. *Cellular Microbiology* 10 (11): 2235-2246.
- Sherameti I., B. Shahollari, Y. Venus, L. Altschmied, A. Varma, R. Oelmüller** (2005): The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *Journal of Biological Chemistry* 280 (28): 26241-26247.
- Sherameti I., S. Tripathi, A. Varma, R. Oelmüller** (2008a): The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (6): 799-807.
- Sherameti I., Y. Venus, C. Drzewiecki, S. Tripathi, V. M. Dan, I. Nitz, A. Varma, F. M. Grundler, R. Oelmüller** (2008b): PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *The Plant Journal* 54: 428-439.
- Shuman S.** (1994): Novel-approach to molecular-cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry* 269 (51): 32678-32684.

- Sirrenberg A., C. Goebel, S. Grond, N. Czempinski, A. Ratzinger, P. Karlovsky, P. Santos, I. Feussner, K. Pawlowski** (2007): *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* 131 (4): 581-589.
- Sorek N., L. Poraty, H. Sternberg, E. Bar, E. Lewinsohn, S. Yalovsky** (2007): Activation status-coupled transient S acylation determines membrane partitioning of a plant Rho-related GTPase. *Molecular and Cellular Biology* 27 (6): 2144-2154.
- Staiger C. J., M. Yuan, R. Valenta, P. J. Shaw, R. M. Warn, C. W. Lloyd** (1994): Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Current Biology* 4 (3): 215-219.
- Staiger C. J. und L. Blanchoin** (2006): Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 554-562.
- Stein E., A. Molitor, K.-H. Kogel, F. Waller** (2008): Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiology* 49 (11): 1747-1751.
- Takai Y., T. Sasaki, T. Matozaki** (2001): Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews* 81 (1):153-208.
- Takemoto D., D. A. Jones, A. R. Hardham** (2003): GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete pathogens. *Plant Journal* 33 (4): 775-792.
- Tanaka A., D. Takemoto, G.-S. Hyon, P. Park, B. Scott** (2008): NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. *Molecular Microbiology* 68 (5): 1165-1178.
- Tao L.-Z., A. Y. Cheung, H.-M. Wu** (2002): Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. *The Plant Cell* 14: 2745-2760.
- Tao L.-Z., A. Y. Cheung, C. Nibau, H.-M. Wu** (2005): RAC GTPases in tobacco and *Arabidopsis* mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins. *The Plant Cell* 17: 2369-2383.
- Teale W. D., I. A. Paponov, K. Palme** (2006): Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Molecular Cell Biology* 7: 847-859.
- Thatcher L. F., J. M. Manners, K. Kazan** (2009): *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 58: 927-939.
- Thomas C., M. Dieterle, S. Gatti, C. Hoffmann, F. Moreau, J. Papuga, A. Steinmetz** (2008): Actin bundling via LIM domains. *Plant Signaling & Behavior* 3 (5): 320-321.
- Thomas C., S. Tholl, D. Moes, M. Dieterle, J. Papuga, F. Moreau, A. Steinmetz** (2009): Actin bundling in plants. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66: 940-957.
- Trotochaud A. E., T. Hao, G. Wu, Z. Yang, S. E. Clark** (1999): The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *The Plant Cell* 11: 393-405.

- Uknes S., B. Mauchmani, M. Moyer, S. Potter, S. Williams, S. Dincher, D. Chandler, A. Slusarenko, E. Ward, J. Ryals (1992):** Acquired-resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4 (6): 645-656.
- Vadassery J., C. Ritter, Y. Venus, I. Camehl, A. Varma, B. Shahollari, O. Novak, M. Strnad, J. Ludwig-Muller, R. Oelmüller (2008):** The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (10): 1371-1383.
- Vadassery J., S. Ranf, C. Drzewiecki, A. Mithöfer, C. Mazars, D. Scheel, J. Lee, R. Oelmüller (2009a):** A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *The Plant Journal* 59: 193-206.
- Vadassery J., S. Tripathi, R. Prasad, A. Varma, R. Oelmüller (2009b):** Monodehydroascorbate reductase 2 and dehydroascorbate reductase 5 are crucial for a mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 166 (12): 1263-1274.
- Varma A., S. Verma, Sudha, N. Sahay, B. Butehorn, P. Franken P (1999):** *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (6): 2741-2744.
- Verma S., A. Varma, K.-H. Rexer, A. Hassel, G. Kost, A. Sarbhoy, P. Bisen, B. Bütehorn, P. Franken (1998):** *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* 90 (5): 896-903.
- Vernoud V., A. C. Horton, Z. Yang, E. Nielsen (2003):** Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 1191-1208.
- Voigt B., A. C. J. Timmers, J. Šamaj, J. Müller, F. Baluška, D. Menzel (2005):** GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *European Journal of Cell Biology* 84: 595-608.
- Wagner U., R. Edwards, D. P. Dixon, F. Mauch (2002):** Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 49 (5): 515-532.
- Waller F., B. Achatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Hückelhoven, C. Neumann, D. von Wettstein, P. Franken, K. H. Kogel (2005):** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* 102 (38): 13386-13391.
- Wang Y. S., C. M. Motes, D. R. Mohamalawari, E. B. Blancaflor (2004):** Green fluorescent protein fusions to *Arabidopsis* fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 59 (2): 79-93.
- Wang Y.-S., C. –M. Yoo, E. B. Blancaflor (2008):** Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytologist* 177: 525-536.

- Wang L., K. Tsuda, M. Sato, J. D. Cohen, F. Katagiri, J. Glazebrook** (2009): *Arabidopsis* CaM Binding Protein CBP60g Contributes to MAMP-Induced SA Accumulation and Is Involved in Disease Resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLOS Pathogenes* 5 (2): e1000301.
- Wasteneys G. und M. E. Galway** (2003): Remodeling the actin cytoskeleton for growth and form: An overview with some new views. *Annual Review of Plant Biology* 54: 691-722.
- Weiss M., M.-A. Selosse, K.-H. Rexer, A. Urban, F. Oberwinkler** (2004): Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research* 108 (9):1003-1010.
- Winge P., T. Brembu, A. M. Bones** (1997): Cloning and characterization of Rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 35: 483-495.
- Winge P., T. Brembu, R. Kristensen, A. M. Bones** (2000): Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 156: 1959-1971.
- Wu G., Y. Gu, S. Li, Z. Yang** (2001): A genome-wide analysis of *Arabidopsis* Rop-interactive CRIB-motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell* 13: 2841-2856.
- Xin Z., Y. Zhao, Z.-L. Zheng** (2005): Transcriptome analysis reveals specific modulation of abscisic acid signaling by ROP10 small GTPase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 1350-1365.
- Yalovsky S., D. Bloch, N. Sorek, B. Kost** (2008): Regulation of membrane trafficking, cytoskeleton dynamics, and cell polarity by ROP/RAC GTPases. *Plant Physiology* 147: 1527-1543.
- Yang N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, K. Kangawas, E. Nishida, K. Mizuno** (1998): Cofilin phosphorylation by LIM-Kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganisation. *Nature* 393: 809-812.
- Yang Z.** (2002): Small GTPases: Versatile signaling switches in plants. *The Plant Cell* 14: 375-388.
- Yang G., P. Gao, H. Zhang, S. Huang, Z.-L. Zheng** (2007): A mutation in *MRH2* Kinesin enhances the root hair tip growth defect caused by constitutively activated ROP2 small GTPase in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* 2 (10): e1074. doi: 10.1371/journal. Pone. 0001074, open access.
- Yang Z. und Y. Fu** (2007): ROP/RAC GTPase signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 490-494.
- Ye J. R., Y. Y. Zheng, A. Yan, N. Z. Chen, Z. K. Wang, S. J. Huang, Z. B. Yang** (2009): *Arabidopsis* Formin3 directs the formation of actin cables and polarized growth in pollen tubes. *Plant Cell* 21 (12): 3868-3884.
- Yokota E., S. Muto, T. Shimmen** (2000): Calcium-calmodulin suppresses the filamentous actin-binding activity of a 135-kilodalton actin-bundling protein isolated from lily pollen tubes. *Plant Physiology* 123 (2): 645-654.

- Yokota E., L. Vidali, M. Tominaga, H. Tahara, H. Orii, Y. Morizane, P. K. Hepler, T. Shimmen** (2003): Plant 115-kDa actin-filament bundling protein, P-115-ABP, is a homologue of plant villin and is widely distributed in cells. *Plant and Cell Physiology* 44 (10): 1088-1099.
- Yokota K., E. Fukai, L. H. Madsen, A. Jurkiewicz, P. Rueda, S. Radutoiu, M. Held, Md S. Hossain, K. Szczygłowski, G. Morieri, G. E. D. Oldroyd, J. A. Downie, M. W. Nielsen, A. M. Rusek, S. Sato, S. Tabata, E. K. James, H. Oyaizu, N. Sandal, J. Stougaard** (2009): Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *The Plant Cell* 21: 267-284.
- Yushmanov S. V. und Chumakov K. M.** (1988): Algorithms of the maximum topological similarity phylogenetic trees construction. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 3: 9-15.
- Zhang Y. und S. McCormick** (2007): A distinct mechanism regulating a pollen-specific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 104 (47): 18830-18835.
- Zhao S. und X. Qi** (2008): Signaling in plant disease resistance and symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (7): 799-807.
- Zheng Z. L. und Z. Yang** (2000): The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant Molecular Biology* 44: 1-9.
- Zheng Z., M. Nafisi, A. Tam, H. Li, D. N. Crowell, S. N. Chary, J. I. Schroeder, J. Shen, Z. Yang** (2002): Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 2787-2797.
- Zimmermann G., H. Bäumlein, H. P. Mock, A. Himmelbach, P. Schweizer** (2006): The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiology* 142 (1): 181-192.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Oelmüller für die Vergabe des interessanten Themas, die fachliche Betreuung und die gewährte Freiheit bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit sowie das Verständnis für häufige Kinderkrankheiten bedanken.

Ganz besonders dankbar bin ich Frau Dr. Bationa Shahollari für die Einarbeitung, fachliche Betreuung und andauernde Freundschaft. Mein herzlichster Dank gilt auch Heide Becker für ihre Hilfe im Labor, Pflege der Pflanzen mit anschließender Entsorgung und ihre motivierenden Gespräche. Iris Camehl möchte ich für ihre große Hilfsbereitschaft im Laboralltag und kritische Durchsicht des Manuskripts danken. Frau Dr. Birgit Perner danke ich für die Hilfe bei der Einarbeitung am ApoTome-Mikroskop und bei der Auswertung der Bilder. Bei Frau Dr. Katrin Boywitz und Kai-Uwe Schmidtke möchte ich mich für die Einarbeitung in die *real-time*-PCR bedanken. Kristin Schöffler danke ich für die Unterstützung bei der RNA-Isolation. Bei PD Dr. Thomas Pfannschmidt möchte ich mich für seinen fachlichen Rat bedanken. Dr. Jyothi Vadassery, Joy M. Johnson und Eileen Seebald danke ich für ihre Hilfe bei der Arbeit am Luminometer und der Auswertung der Daten. Unseren technischen Assistentinnen Sarah und Claudia möchte ich für zahlreiche unterstützende Tätigkeiten im Laboralltag danken. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Boris Voigt und Dr. Stefanie Ranf für die Bereitstellung des GFP-FABD2- bzw. pMAQ-transformierten Saatgutes. Dr. Jeannette Pfalz und Dr. Harald Kellner möchte ich für die Durchsicht des Manuskripts und Dr. Lars Dietzel für die freundliche Beantwortung zahlreicher Fragen danken. Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Meinem Lebensgefährten Sebastian Miethbauer danke ich für seine Geduld und die Manuskriptdurchsicht. Unserem Sohn Johannes danke ich dafür, dass er mich allen Arbeits-Stress vergessen lässt.

Publikationen

- Oelmüller R., B. Shahollari, T. Pěskan-Berghöfer, A. Trebicka, P.H. Giong, I. Sherameti, M. Oudhoff, Y. Venus, L. Altschmied, A. Varma** (2004): Molecular analyses of the interaction between *Arabidopsis* roots and the growth-promoting fungus *Piriformospora indica*. *Endocytobiosis and Cell Research* 15 (2): 504-517.
- Sherameti I., B. Shahollari, Y. Venus, L. Altschmied, A. Varma, R. Oelmüller** (2005): The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *Journal of Biological Chemistry* 280 (28): 26241-26247.
- Wisseemann V., H. Baumbach, S. Müller, Y. Venus, F. H. Hellwig** (2007): Small scale analysis of population structure in the woody cornelian cherry *Cornus mas* L. (Cornaceae) by AFLP accentuates the need for a population based conservation strategy. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 81 (2): 175-177.
- Sherameti I., Y. Venus, C. Drzewiecki, S. Tripathi, V. M. Dan, I. Nitz, A. Varma, F. M. Grundler, R. Oelmüller** (2008): PYK10, a beta-glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant Journal* 54 (3): 428-439.
- Vadassery J., C. Ritter, Y. Venus, I. Camehl, A. Varma, B. Shahollari, O. Novak, M. Strnad, J. Ludwig-Muller, R. Oelmüller** (2008): The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (10): 1371-1383.
- Camehl I., I. Sherameti, Y. Venus, G. Bethke, A. Varma, J. Lee, R. Oelmüller** (2010): Ethylene signalling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and nonbeneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana* (p). *New Phytologist* 185 (4): 1062-1073.
- Venus Y. und R. Oelmüller** (2010): The small GTPases ROP1 and ROP6 regulate the reorganization of the actin cytoskeleton and the gene expression during the beneficial interaction between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. (in Vorbereitung).

Tagungsbeiträge

Vortrag:

Venus Y. (2006): Are small GTPases involved in the recognition of *Piriformospora indica* by *Arabidopsis thaliana*? 4. Mitteldeutsche Pflanzenphysiologie-Tagung, Dresden, 20.-21. Januar.

Poster:

Venus Y., F. Hellwig, V. Wissemann (2003): The influence of cleistogamous and chasmogamous seed set on genetic variability of violet populations (*Viola*, Violaceae). 16th International Symposium Biodiversity and Evolutionary Biology of the German Botanical society - Botanikertagung, Frankfurt a. M., 21.-27. September.

Shahollari B., Y. Venus, C. Drzewiecki, R. Oelmüller (2005): Recognition of the growth-promoting fungus *Piriformospora indica* by *Arabidopsis thaliana* roots. 3th Biannual Symposium of the IMPRS: The Exploration of Ecological Interactions with Molecular and Chemical Techniques, Jena, 4.-5. November.

Sherameti I., Y. Venus, G. Bethke, J. Lee, A. Varma, R. Oelmüller (2007): Promotion of growth and seed yield in *Arabidopsis* induced by the endophytic fungus *Piriformospora indica* require the ethylene signalling components EIN2 and EIN3/EIL1, but no jasmonic acid. 10th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Gmunden (Österreich), 10.-13. September.

Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät (Friedrich-Schiller-Universität Jena) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Oelmüller angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe, wobei mir die in der Danksagung erwähnten Personen unterstützend bei den aufgeführten Untersuchungen geholfen haben. Mir ist die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt. Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsleistung vorgelegt wurde. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Jena, 10. Juni 2010

Yvonne Venus